

**SELEKTION, EX-VIVO EXPANSION UND ANALYSE DER  
DIFFERENZIERUNGSKAPAZITÄT HUMANER CD133 POSITIVER  
STAMMZELLEN AUS DEM PERIPHEREN BLUT**

vorgelegt von  
**SONJA LOGES**  
aus Paderborn

**DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
im Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

Hamburg 2004

Datum der Disputation: 02.07.2004

Gutachter: Prof. Dr. W. Fiedler

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
2.1	Stammzellen .....	7
2.2	Definition von Stammzellen .....	8
2.3	Embryonale und adulte Stammzellen .....	8
2.4	Hämatopoetische Stammzellen und Hämatopoiese .....	14
2.5	Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen I: Assaysysteme .....	16
2.5.1	In-vivo Transplantationsassay .....	16
2.5.2	In-vitro Analyse des koloniebildenden Potenzials .....	17
2.6	Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen II: Zelloberflächenmarker .....	18
2.7	Phänotypische und ontogenetische Überlappungen zwischen hämatopoetischen und endothelialen Zellen: Hinweise auf die Existenz von postnatalen Hämangioblasten .....	22
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
4.1	Bezugsquellen der Geräte .....	35
4.2	Bezugsquellen der Reagenzien und Zellen .....	36
4.3	Bezugsquellen der Verbrauchsmaterialien .....	37
4.4	Bezugsquellen der primären Antikörper .....	38
4.5	Bezugsquellen der sekundären Antikörper .....	40
4.6	Generierung von Leukaphereseprodukten .....	40
4.7	Aufreinigung von CD133 positiven Zellen aus Leukaphereseprodukten .....	42
4.7.1	Isolierung der mononukleären Zellen aus gefrorenen Leukaphereseprodukten .....	42
4.7.2	Isolierung der mononukleären Zellen aus frischen Leukaphereseprodukten .....	43
4.7.3	Immunmagnetische Selektion von CD133 positiven Zellen aus den mononukleären Zellen von Leukaphereseprodukten .....	43
4.8	Kultivierung von CD133 positiven Zellen I: Expansion .....	44
4.9	Isolierung von mononukleären Zellen gesunder Spender .....	46
4.10	In-vitro Analysen von proliferierenden und differenzierenden Stammzellen .....	46
4.10.1	Morphologie und Proliferation .....	46
4.10.2	Durchflusszytometrische Analyse von Stammzellmarkern, Endothelmarkern und hämatopoetischen Markern .....	46

4.10.3	Bestimmung des koloniebildenden Potenzials von ex-vivo expandierten Stammzellen: Analyse von hämatopoetischen und endothelialen Kolonien .....	48
4.11	In-vivo Analyse von proliferierenden Stammzellen: Repopulationsassay in NOD-SCID-Mäusen .....	50
4.11.1	Transplantation von expandierten CD133 positiven Zellen in NOD-SCID Mäuse .....	50
4.11.2	Analyse des Anwachsens humaner Zellen (Engraftment) .....	51
4.12	Zellkultur .....	52
4.13	Real-Time PCR-Analyse der Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2 in ex-vivo expandierten CD133 positiven Stammzellen .....	52
4.13.1	Isolation von RNA und Synthese von cDNA .....	52
4.13.2	Real-Time PCR.....	53
4.14	Kultivierung von CD133 positiven Zellen II: Differenzierung in endothiale Zellen.....	55
4.15	Immunfluoreszenzanalyse von Endothelmarkern .....	56
4.16	Retrovirale Transduktion von CD133 positiven Zellen .....	57
4.17	Generierung von Einzelzellkulturen durch Fluoreszenzaktiviertes Cell Sorting (FACS).....	59
4.18	Generierung von Einzelzellkulturen durch Limiting Dilution.....	60
4.19	Kultivierung von Einzelzellklonen CD 133 positiver Zellen: Differenzierung in endothiale Zellen .....	60
4.20	Kultivierung von Einzelzellklonen CD 133 positiver Zellen: Differenzierung in hämatopoetische Zellen .....	61
4.21	Analyse der Zelloberflächenmarker der aus einer Zelle differenzierten Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen .....	61
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>64</b>
5.1	Isolierung von CD133 positiven Zellen.....	64
5.2	Ex-vivo Expansion von humanen hämatopoetischen Stammzellen: Morphologie .....	65
5.3	Ex-vivo Expansion von humanen hämatopoetischen Stammzellen: Analyse der Proliferationskinetik .....	67
5.4	Phänotypische Analyse von ex-vivo expandierten Stammzellen: Durchflusszytometrie.....	71
5.4.1	Durchflusszytometrie von ex-vivo expandierten Stammzellen: Analyse der Stammzellmarker CD133, CD34, CD90, CD117 und CD7 .....	73
5.4.2	Durchflusszytometrie von ex-vivo expandierten Stammzellen: Analyse der Endothelmarker CD144 (VE-Cadherin) und von Willebrand Faktor .....	76
5.4.3	Durchflusszytometrie von ex-vivo expandierten Stammzellen: Analyse der Endothel- und monozytenmarker CD14 und CD105 .....	78
5.4.4	Bestimmung des koloniebildenden Potenzials der ex-vivo expandierten Stammzellen: Analyse von	

<b>5</b>	<b>hämatoopoetischen und endothelialen Kolonien (Colony Assays) .....</b>	<b>79</b>
5.5	Analyse des Engraftments transplantiert er expandierter CD133 positiver Stammzellen in NOD-SCID Mäusen.....	82
5.6	Real-Time PCR-Analyse der Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2 in ex-vivo expandierten Stammzellen .....	91
5.7	Endotheliale Differenzierung von expandierten CD133 positiven Zellen .....	95
5.8	In-vitro Analysen von expandierten und endothelial differenzierten Stammzellen .....	96
5.8.1	Immunfluoreszenzanalysen .....	96
5.9	Retrovirale Transduktion von CD133 positiven Zellen .....	100
5.10	Analyse der Differenzierungskapazität von Stammzellen auf Einzelzellebene: Nachweis des postnatalen Hämangioblasten .....	102
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>107</b>
6.1	Ausblick .....	125
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>142</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>145</b>

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Adulte humane, multipotente hämatopoetische Stammzellen sind durch die Expression des Antigens CD133 charakterisiert. Diese Zellen ( $CD133^+$ ) haben möglicherweise ein breites Differenzierungspotenzial auch in nicht-hämatopoetische Gewebe und könnten deshalb für neue Therapieansätze genutzt werden. Zurzeit wird die Anwendung solcher stammzellbasierter Therapieformen aber noch durch die niedrige Frequenz der  $CD133^+$  Zellen in Blut und Knochenmark limitiert.

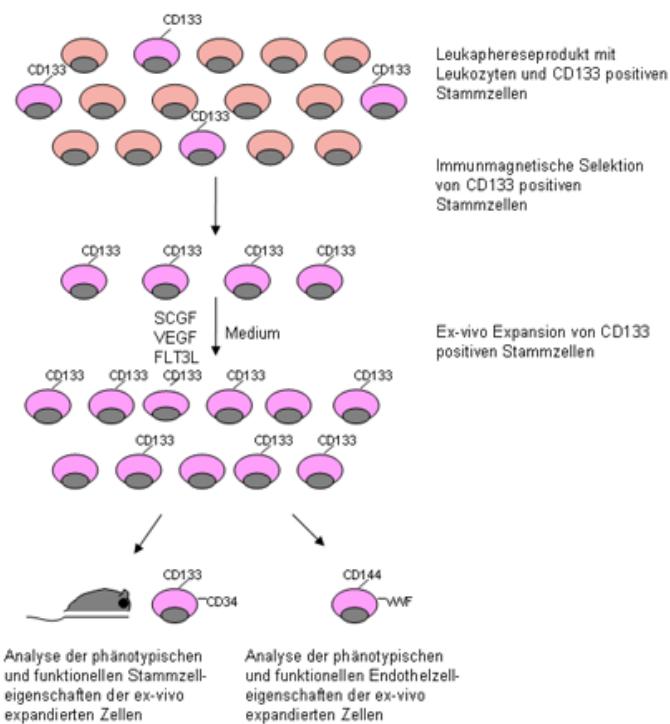
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die ex-vivo Expandierbarkeit und die Differenzierungskapazität von hämatopoetischen  $CD133^+$  Stammzellen aus dem peripheren Blut in die hämatopoetische und endotheliale Richtung untersucht. Dabei wurde diese Zellpopulation auch auf Einzelzellebene analysiert, um festzustellen, ob  $CD133^+$  Zellen gemeinsame Ursprungszellen für Blut- und Blutgefäßzellen, so genannte Hämangioblasten, enthielten.

Mittels einer immunmagnetischen Methode konnten  $CD133^+$  Stammzellen in hoher Reinheit (ca. 98%) aus Leukaphereseprodukten isoliert werden. Anschließend wurde ein auf den Zytokinen SCGF, VEGF und FLT3L basierendes Zellkultursystem entwickelt, mit dem die isolierten Zellen ex-vivo expandiert werden konnten. Der Faktor der Zellzahlzunahme betrug nach 5 Wochen in den Expansionskulturen im Mittel 2190. Immunphänotypische Analysen von Stammzellmarkern in diesem Kulturzeitraum ergaben eine Expansion der  $CD133^+$  Zellen um das 260-fache und der  $CD34^+$  Zellen um das 36-fache. Funktionelle Stammzellassays zeigten eine Zunahme des koloniebildenden Potenzials der ex-vivo expandierten Stammzellen. Die Zahl der unreifen, multipotenten CFU-GEMM Kolonien nahm um den Faktor 48 zu.

Über 32 Tage kultivierte Stammzellen konnten das durch Bestrahlung abgetötete Knochenmark von immuninkompetenten NOD-SCID Mäusen repopulieren. Drei Monate nach der Transplantation waren bei 75% der Tiere menschliche Blutzellen aller Linien nachweisbar, was das Vorhandensein funktioneller, multipotenter und zur Selbsterneuerung fähiger Stammzellen in den Expansionskulturen belegte.

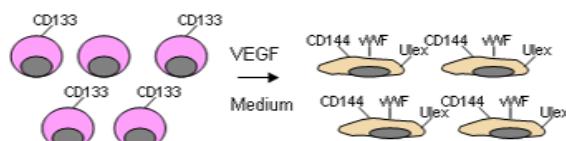
Funktionelle und immunphänotypische Analysen der expandierten  $CD133^+$  Zellen ergaben außerdem, dass auch Endothelprogenitorzellen unter den etablierten Kulturbedingungen erfolgreich proliferieren konnten. Die Populationen der die Endothelmarker VE-Cadherin und vWF exprimierenden Zellen vermehrten sich in fünf Wochen um mehr als den Faktor 10000. Endotheliale Colony-Assays zeigten eine fast 2000-fache Zunahme der Progenitoren mit endothelialer Potenz.

Zusammenfassend lässt sich für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit feststellen, dass Zellkulturbedingungen entwickelt wurden, durch die sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch Endothelprogenitorzellen ohne Verlust des Differenzierungspotenzials ex-vivo expandiert werden konnten (s. Schema in Abbildung 1).



**Abbildung 1: Aufreinigung, Expansion und funktionelle sowie phänotypische Analyse der CD133<sup>+</sup> Zellen.**

Anschließend wurde untersucht, ob sich die expandierten CD133<sup>+</sup> Zellen morphologisch und phänotypisch in Endothelzellen differenzieren konnten. Dazu wurden diese Zellen ausschließlich mit VEGF weiterkultiviert. Das führte dazu, dass ein Teil der Zellen adhärent wurde und eine endothiale Morphologie annahm. Adhäsente und nicht adhäsente Zellen exprimierten zu 100% die endothelialen Zelloberflächenmoleküle Ulex europaeus Rezeptor, vWF und VE-Cadherin.



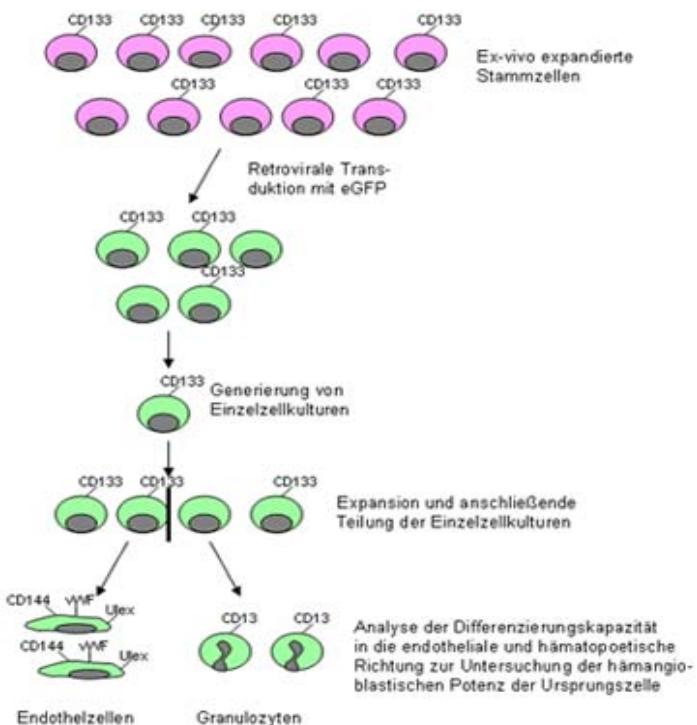
**Abbildung 2: Analyse der Differenzierungskapazität der ex-vivo expandierten Stammzellen in reife Endothelzellen.**

So wurde gezeigt, dass ausreichende Mengen an autologen Endothelzellen für den klinischen Einsatz, z.B. für Patienten mit Herzinfarkt oder Durchblutungsstörungen, gewonnen werden konnten. Der experimentelle Ansatz ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die proliferierenden CD133<sup>+</sup> Zellen retroviral mit dem grün fluoreszierenden Markergen eGFP transduziert. Mit Hilfe dieser Markierung konnte auf Einzelzellebene untersucht werden, ob diese Zellpopulation Stammzellen enthielt, die sich sowohl in hämatopoetische als auch in endothiale Zellen differenzieren konnten.

Dazu wurden ex-vivo Expansionskulturen einzelner GFP-positiver Zellen angelegt. Deren Nachkommen wurden aufgeteilt und je eine Hälfte des Klons endothelial bzw. hämatopoetisch differenziert. Mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz, der Analyse der Kernmorphologie mit einem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff sowie von Zelloberflächenmarkern mit rot-fluoreszierenden Antikörpern wurden Granulozyten und Endothelzellen als Nachkommen einer Ursprungszelle identifiziert (s. Schema in Abbildung 3).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die expandierte Zellpopulation postnatale Hämangioblasten in einer Frequenz von 1,8% enthielt.



**Abbildung 3: Analyse der hämangioblastischen Potenz der ex-vivo expandierten Stammzellen.**

## **2 EINLEITUNG**

### **2.1 STAMMZELLEN**

Stammzellen gewinnen zunehmend Bedeutung in der biologischen und medizinischen Forschung sowie für neue Therapieansätze. Der entscheidende Grund dafür ist ihre Fähigkeit, spezialisierte Gewebe in physiologischen und pathophysiologischen Situationen zu regenerieren.

Diese Eigenschaft macht sie einerseits zu einem Modellsystem für entwicklungsbiologische Fragestellungen und andererseits zu einem potenziellen Therapeutikum für Krankheitszustände mit Untergang von Gewebezellen wie z.B. Myokardinfarkte, Diabetes mellitus Typ I, Morbus Parkinson, Leberzirrhose oder periphere Durchblutungsstörungen (Weissman, 2000).

Humane hämatopoetische Stammzellen werden seit Jahrzehnten z.B. bei Leukämien, aplastischen Anämien oder Thalassämien als Transplantate verwandt, um das maligne oder dysfunktionale Knochenmark zu ersetzen (Gratwohl et al., 2002; Verfaillie, 2002).

Seit einigen Jahren wird außerdem versucht, genetische Defekte von hämatopoetischen Stammzellen mittels gentherapeutischer Ansätze zu korrigieren und Patienten die Zellen mit der korrekten genetischen Information zu reinfundieren. Dieser Ansatz war z.B. mit Hilfe von retroviralen Vektoren bei der Adenosin-Desaminase-Defizienz, einem Enzymmangel, der zu einem schweren Immundefekt führt, erfolgreich (Aiuti et al., 2002; Muul et al., 2003). Es bleibt aber zu bedenken, dass diese Vektoren zwar die höchste Gentransfereffizienz besitzen, sich aber zufällig in das Genom der Zellen integrieren. Das hat zu der Entstehung von leukämischen Krankheitsbildern in Mensch und Maus geführt (Baum et al., 2003; Baum et al., 2004; Li et al., 2002).

Deshalb ist es entscheidend, Stammzellen für eine mögliche therapeutische Anwendung sorgfältig in-vitro und auch in Tiermodellen zu evaluieren, um die Sicherheit zellbasierter Therapien zu erhöhen.

## **2.2 DEFINITION VON STAMMZELLEN**

Stammzellen sind als undifferenzierte Zellen definiert, die bei der Zellteilung zwei Tochterzellen produzieren können, von denen eine den Stammzellphänotyp behält und die andere sich in mindestens einen bestimmten Zelltyp differenziert. Durch diese asymmetrische Zellteilung haben Stammzellen die einzigartige Eigenschaft, sich zu differenzieren und gleichzeitig selbst zu erneuern (Raff, 2003).

Dieses theoretische Konzept wurde 1961 erstmalig von Becker et al. bestätigt. Sie wiesen in der Maus die Existenz von klonogenen Knochenmarkzellen nach, welche in der Milz Kolonien aller Blutzelllinien bildeten. Einige dieser Blutzellkolonien enthielten Zellen, die selbst neue Kolonien bilden konnten. Damit war durch einen experimentellen Ansatz bewiesen, dass Stammzellen existieren, welche Ursprungszellen für differenzierte Nachkommen sein und sich gleichzeitig selbst propagieren können (Becker et al., 1963). Manche Autoren fordern weiter, dass diese Selbsterneuerung über die gesamte Lebensdauer des jeweiligen Organismus anhält (Raff, 2003).

Die Mechanismen, welche dazu führen, dass die jeweilige Tochterzelle Stammzelle bleibt oder eine Vorläuferzelle für einen bestimmten differenzierten Zelltyp wird, sind bis heute nicht bekannt. Die Regulation dieses Vorgangs erfolgt durch Proteine der Mutterzelle oder durch die lokale Umgebung, in der die Zellteilung stattfindet. Möglicherweise spielen aber auch beide Faktoren eine Rolle (Spradling et al., 2001; Watt und Hogan, 2000).

## **2.3 EMBRYONALE UND ADULTE STAMMZELLEN**

Es wird grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Klassen von Stammzellen unterschieden, nämlich embryonalen Stammzellen und adulten Stammzellen, welche auch als somatische Stammzellen bezeichnet werden. Um diese beiden Gruppen klar voneinander abgrenzen zu können, muss man die Entwicklung eines Säugetierembryos genauer betrachten.

Die Embryonalentwicklung beginnt mit der Entstehung einer Zygote, aus der sich der gesamte Organismus entwickeln kann und die damit totipotent ist. Innerhalb von 30 Stunden teilt sich die Zygote zum ersten Mal und durchläuft anschließend

weitere Furchungsteilungen. Die entstehenden Blastomere werden bis zum 8-Zellstadium als totipotent betrachtet.

Die Zygote entwickelt sich über das Morula-Stadium aus 12-16 Zellen am 3.-5. Entwicklungstag zur Blastozyste, die aus einer inneren Zellmasse und einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblasten, sowie einer flüssigkeitsgefüllten Höhle besteht. Die innere Zellschicht besteht zu diesem Zeitpunkt aus ca. 30 Zellen und wird Embryoblast genannt.

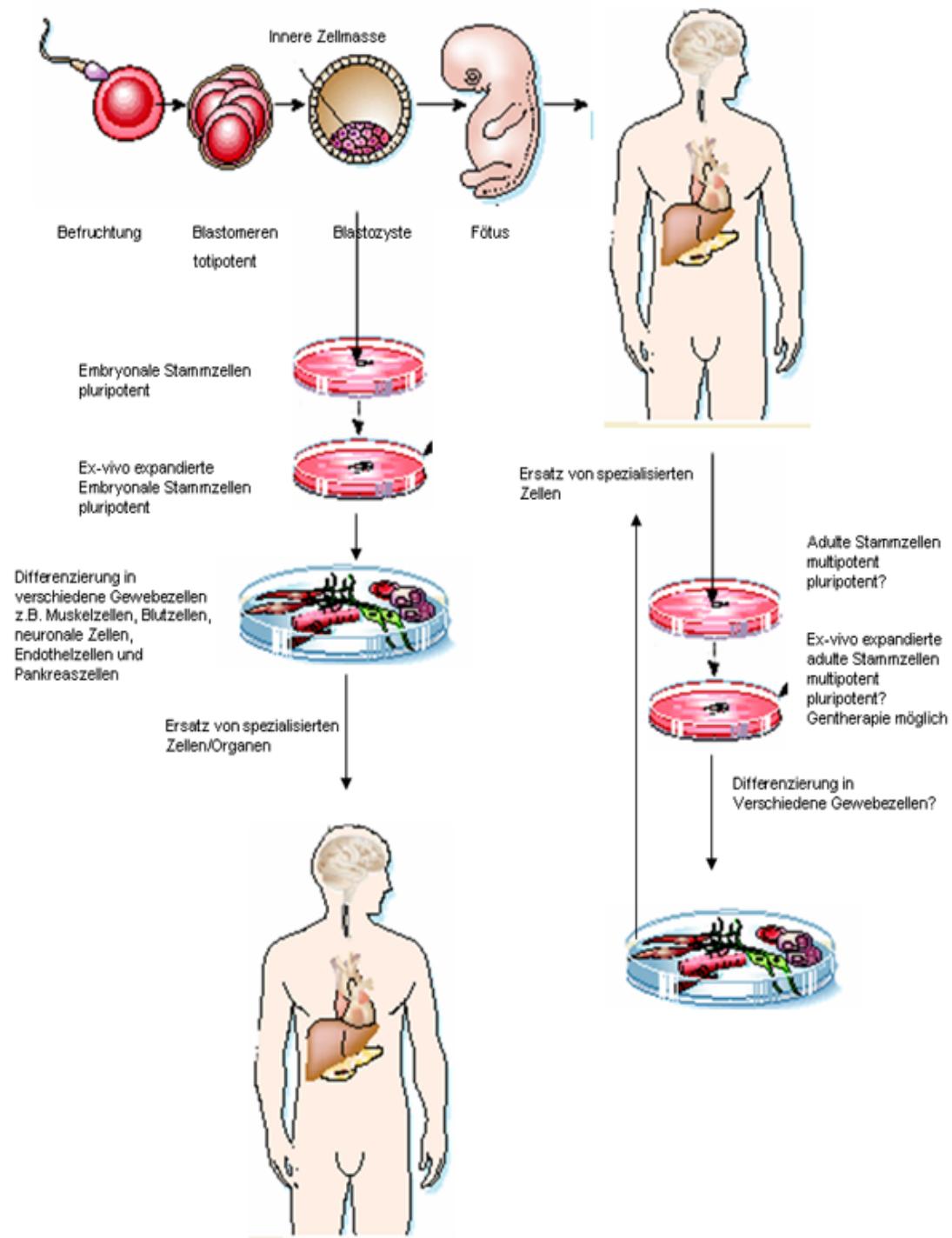
Dieser bildet in der zweiten Entwicklungswoche zunächst das Ektoderm und das Endoderm und in der dritten Woche das Mesoderm. Diese drei Keimblätter sind der Ursprung für alle differenzierten Gewebe des sich entwickelnden Organismus. Aus der inneren Zellmasse von menschlichen Blastozysten, die für in-vitro Fertilisationen erzeugt, dafür aber nicht mehr benötigt wurden, wurden fast 20 Jahre nach Etablierung der ersten murinen ES-Linien, im Jahre 1998 erstmalig auch humane embryonale Stammzelllinien generiert. (Martin, 1981; Thomson et al., 1998).

Embryonale Stammzellen sind pluripotent: sie können sich in alle Gewebezellen des Körpers inklusive der Keimzellen differenzieren, sie teilen sich unbegrenzt in Zellkultur, ohne dabei zu altern oder ihr Differenzierungspotenzial zu verlieren. Man bezeichnet sie nicht als totipotent, weil sie nicht in der Lage sind, die extraembryonalen Gewebe, die für die Säugetierentwicklung notwendig sind, zu bilden (McKay, 2000).

Die oben beschriebenen Eigenschaften machen embryonale Stammzellen möglicherweise zu einem einzigartigen neuen Therapeutikum für pathologische Zustände, die mit dem Verlust oder der Dysfunktionalität spezialisierter Gewebezellen des Körpers einhergehen. Außerdem sind die ES-Zellen ein neues Modellsystem, um die grundlagenwissenschaftliche Erforschung von entwicklungsbiologischen Fragestellungen voranzutreiben (Donovan und Gearhart, 2001).

Die Abbildung 4 auf Seite 10 veranschaulicht die Gewinnung und die mögliche Anwendung von embryonalen Stammzellen.

Ein Problem der Verwendung embryonaler Stammzellen besteht jedoch darin, dass sie aus menschlichen Embryonen erzeugt werden, die zur Gewinnung der embryonalen Stammzellen getötet werden müssen, was zur Zeit in Deutschland durch das Grundgesetz verboten ist (McLaren, 2001).



**Abbildung 4: Differenzierungspotenzial von embryonalen und adulten Stammzellen (Donovan und Gearhart, 2001).** Embryonale Stammzellen können aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert und anschließend ex-vivo expandiert und in verschiedene Gewebetypen differenziert werden, die möglicherweise als Organersatz dienen könnten. Adulte Stammzellen können z.B. aus dem menschlichen Knochenmark isoliert werden. Sie können sich auch in Zellen verschiedener Gewebe differenzieren und deshalb eventuell therapeutisch eingesetzt werden.

Problematisch ist auch die Histoinkompatibilität der ES-Zellen mit möglichen Empfängern, deren Immunsystem die transplantierten Zellen abstoßen kann. Man könnte die Abstoßungsprobleme möglicherweise dadurch umgehen, dass man mit Hilfe der bei dem geklonten Schaf Dolly angewandten Technologie des Transfers eines Zellkerns einer somatischen Zelle in eine entkernte Eizelle histokompatible ES-Zellen für den jeweiligen Patienten erzeugt (Campbell et al., 1996). Das oben beschriebene ethische Problem bleibt jedoch bestehen, und es stellt sich außerdem die Frage, ob das gegenwärtige Gesundheitssystem die enormen Kosten für diese aufwendige Technologie tragen kann.

Außerdem wurde in Experimenten mit Mäusen gezeigt, dass die sehr unreifen embryonalen Stammzellen bösartige Teratome in Empfängertieren induzieren konnten, was eine Verwendung am Menschen weiter in Frage stellt (McKay, 2000).

Die zweite Klasse von Stammzellen mit einer möglichen therapeutischen und entwicklungsbiologischen Bedeutung sind adulte oder somatische Stammzellen, die in den Organen des vollständig entwickelten Organismus vorhanden sind. Von diesen Stammzellen nahm man bis vor wenigen Jahren an, dass sie in ihrem Phänotyp in soweit determiniert sind, dass sie zwar über eine lange Zeit proliferieren, sich aber nur in die Zellen eines bestimmten Gewebetyps differenzieren können. Diese Eigenschaft wurde als Unipotenz bezeichnet. Die Bedeutung dieser adulten Stammzellen wurde in der Aufrechterhaltung der Homöostase und in der Reparatur von Schäden in ihrem jeweiligen Organsystem gesehen. Man war der Ansicht, dass sie nur in Geweben mit einem hohen Zellumsatz, wie z.B. dem Knochenmark, den Schleimhäuten oder der Epidermis vorkommen (Raff, 2003).

In letzter Zeit wurden jedoch unreife Stammzellen in allen Geweben des Körpers nachgewiesen. Außerdem hat eine große Zahl von Experimenten gezeigt, dass adulte Stammzellen sich sowohl in-vitro als auch in-vivo über ihre in der Embryonalentwicklung determinierten somatischen Gewebegrenzen hinaus in verschiedene Gewebe differenzieren können. Dadurch wurde das Dogma der Unipotenz adulter Stammzellen in Frage gestellt und der neue Begriff der Plastizität geprägt. Als Plastizität bezeichnet man in diesem Zusammenhang das Potenzial von Stammzellen, sich in verschiedene Zelltypen aus unterschiedlichen

Geweben zu entwickeln. In der vorliegenden Literatur werden die Begriffe Plastizität und Multipotenz oft synonym verwandt. Unter Multipotenz versteht man die Differenzierungskapazität in verschiedene Zelltypen eines oder mehrerer Gewebe. Pluripotenz bedeutet in diesem Zusammenhang die Fähigkeit von Stammzellen, sich in alle Gewebetypen zu differenzieren. Pluripotenz wird jedoch von manchen Autoren synonym mit Multipotenz benutzt.

Adulte und embryonale Stammzellen sind in der Abbildung 4 auf Seite 10 einander gegenübergestellt.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass in Maus- oder Hühnerembryonen transplantierte adulte Stammzellen sich in Gewebe aus allen drei Keimblättern differenzieren können (Clarke et al., 2000). Damit wurde die Pluripotenz adulter Stammzellen nachgewiesen (Martin-Rendon und Watt, 2003; Pittenger et al., 1999; Prockop et al., 2003; Verfaillie et al., 2003).

In den letzten Jahren wurden so viele Arbeiten zur Plastizität adulter Stammzellen publiziert, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur einige, für die Thematik wichtige Beispiele genannt werden können.

So wurde z.B. gezeigt, dass neuronale Stammzellen und Muskelstammzellen Blutzellen bilden und dass hämatopoetische Stammzellen sich in Muskelzellen, Blutgefäßzellen, Leberzellen und sogar in neuronale Zellen differenzieren können (Bjornson et al., 1999; Brazelton et al., 2000; Ferrari et al., 1998; Goodell et al., 2001; Jackson et al., 1999; Mezey et al., 2000; Petersen et al., 1999).

Adulte Stammzellen haben als potenzielle Modellsysteme und Therapeutika gegenüber ES-Zellen einige Vorteile: sie sind in Form von z.B. Knochenmarkstammzellen leicht zugänglich und das ethische Dilemma der Verwendung von Zellen aus menschlichen Embryonen ergibt sich nicht. Außerdem könnten autologe, patienteneigene Zellen als mögliche Therapeutika benutzt werden, so dass sich nicht das Problem einer immunologischen Abstoßungsreaktion stellt.

Es gibt jedoch auch neuere Arbeiten, welche die Plastizität adulter Stammzellen wieder in Frage stellen. So wurde gezeigt, dass in den Muskeln ansässige hämatopoetische Zellen als Muskelstammzellen fehlgedeutet wurden (McKinney-Freeman et al., 2002).

Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine Fusion von Stammzellen mit spezialisierten Gewebezellen auch für die beschriebene Plastizität verantwortlich sein kann. Damit stellt dies keine echte Plastizität, sondern lediglich eine nukleäre Reprogrammierung des Zellphänotyps dar (Lemischka, 2002b; Wang et al., 2003; Ying et al., 2002).

Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten „Plastizität“ teilweise um in-vitro Artefakte handeln könnte. Außerdem hat es sich als schwierig erwiesen, adulte Stammzellen in Zellkultur zu vermehren, ohne dass sie ausdifferenzieren und ihre Stammzelleigenschaften verlieren.

In der Tabelle 1 sind die oben beschriebenen Vor- und Nachteile embryonaler und adulter Stammzellen im Überblick dargestellt.

**Tabelle 1: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile embryonaler und adulter Stammzellen.**

	Embryonale Stammzellen	Adulte Stammzellen
Vorteile	Pluripotenz	Multipotenz Pluripotenz (?)
	Unbegrenzt in Zellkultur vermehrbar ohne Verlust der Pluripotenz	Leichte Isolierbarkeit
	Kein Auftreten von Seneszenz in Zellkultur	Histokompatible autologe Zellen für individuelle Patienten isolierbar
Nachteile	Ethische Probleme	Pluripotenz kontrovers diskutiert
	Begrenzte Verfügbarkeit von Oozyten	Bei Kultivierung oft Verlust der Multipotenz
	Induktion von bösartigen Teratomen	Seneszenz der Stammzellen in Kultur
	Histoinkompatibilität mit Empfängerorganismus	

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit Differenzierungskapazität und ex-vivo Expandierbarkeit von hämatopoetischen Stammzellen untersucht werden sollen, werden diese Stammzellen im Folgenden näher beschrieben.

## **2.4 HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLEN UND HÄMATOPOESE**

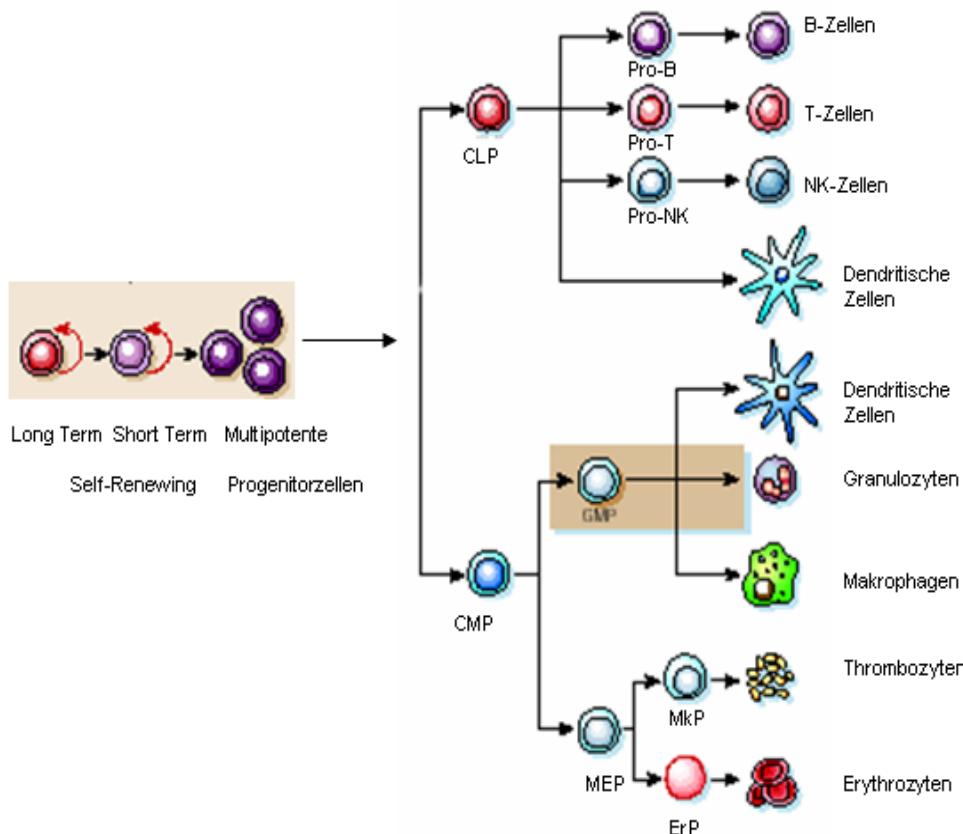
Hämatopoetische Stammzellen sind dadurch charakterisiert, dass durch asymmetrische Zellteilung aus einer Stammzelle während der Lebensdauer eines Organismus jeweils eine Progenitorzelle, aus der sich dann die reifen Blutzellen differenzieren, und eine neue Stammzelle entstehen können (Suda et al., 1984). Durch diesen Mechanismus wird z.B. die enorme Anzahl von Zellen erzeugt, die für die Homöostase des Blutes im menschlichen Organismus erforderlich sind: ca.  $10^{10}$  rote Blutzellen und  $10^8$  bis  $10^9$  weiße Blutzellen werden pro Stunde produziert (Williams-DA, 1995). Der größte Teil der hämatopoetischen Stammzellen eines Säugetierorganismus befindet sich im Knochenmark. Das Knochenmark enthält eine heterogene Stammzellpopulation, in der neben den hämatopoetischen Stammzellen auch z.B. mesenchymale Stammzellen nachweisbar sind.

Anhand von Mausmodellen wurde ein pyramidenförmiges Modell der Organisation der Hämatopoese erarbeitet. An der Spitze der Pyramide steht eine Stammzelle, die man als „long term self renewing“ bezeichnet. Solche Stammzellen können, wenn sie in Mäuse transplantiert werden, deren Knochenmark durch radioaktive Strahlung zerstört wurde, die vollständige Hämatopoese für das gesamte Leben der Maus rekonstituieren.

Aus diesen langfristig repopulierenden Zellen entwickeln sich „short term self-renewing“ Stammzellen, deren Nachkommen die murine Hämatopoese für einen Zeitraum von weniger als zwei Monaten ersetzen können. Aus diesen Stammzellen mit der geringeren Selbsterneuerungspotenz entwickeln sich multipotente Progenitorzellen, die sich in alle reifen Blutzellen differenzieren, sich aber nicht mehr selbst erneuern können.

Aus diesen multipotenten Progenitoren differenzieren sich zwei Populationen von kommitierten Progenitorzellen, die lymphoide (CLP, common lymphoid precursor) und die myeloide (CMP, common myeloid precursor). Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich die B-, T- und NK-Zellen sowie dendritische Zellen. Aus den myeloiden Progenitoren differenzieren sich zunächst die granulozytären-

monozytären (GMP) und die megakaryozytären-erythrozytären Vorläuferzellen (MEP). Die GMPs differenzieren sich in Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen und die MEPs in Megakaryozyten und rote Blutzellen (Reya et al., 2001). Die Abbildung 5 gibt einen Überblick über das oben beschriebene Modell der Hämatopoese.



**Abbildung 5: Entwicklungspotenzial hämatopoetischer Stammzellen (Reya et al., 2001).** Aus den sich für die gesamte Lebenszeit des Organismus selbst erneuernden Stammzellen (long term self renewing) entwickeln sich über die sich nur für kurze Zeit selbst erneuernden Stammzellen (short term self renewing) die stark proliferierenden multipotenten Vorläuferzellen. Aus diesen Progenitorzellen differenzieren sich über die CMP und CLP und weitere Zwischenstufen die reifen lymphatischen und myeloischen Blutzellen (CMP, Common Myeloid Precursor; CLP, Common Lymphoid Precursor; GMP, Granulocyte Monocyte Precursor; MEP, Megakaryocyte Erythrocyte Precursor; ErP, Erythrocyte Precursor).

Auf dem in der Abbildung 5 dargestellten Reifungsweg von den hämatopoetischen Stammzellen, die sich während der gesamten Lebenszeit selbst erneuern (Long Term), über die sich für kurze Zeit selbst erneuernden (Short Term) bis hin zu den

multipotenten Progenitorzellen werden die Zellen immer teilungsaktiver. Sie verlieren dafür aber das Potenzial, sich selbst zu perpetuieren (Morrison et al., 1997; Morrison und Weissman, 1994). Multipotente hämatopoetische Stammzellen machen etwa 0,01% der Knochenmarkzellen aus, 60-70% der Vorläuferzellen sind myeloide Progenitoren, 20-30% sind erythroide Progenitoren und 10% sind Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und multipotente Progenitoren (Williams-DA, 1995).

## **2.5 CHARAKTERISIERUNG HÄMATOPOETISCHER STAMMZELLEN I: ASSAYSYSTEME**

### **2.5.1 IN-VIVO TRANSPLANTATIONSASSAY**

Das entscheidende Kennzeichen einer hämatopoetischen Stammzelle ist ihre Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und multipotente Progenitorzellen zu generieren, die sich in alle reifen Blutzellen differenzieren können. Das wichtigste Testsystem zur Analyse dieser Eigenschaften ist die Transplantation von putativen hämatopoetischen Stammzellen in Mäuse, deren Knochenmark durch Bestrahlung zerstört wurde. Durch die Verwendung immunkompromittierter Mauslinien, wie z.B. NOD-SCID Mäusen, wird die immunologische Abstoßung von xenogenen menschlichen Zellen umgangen.

Enthalten die zu untersuchenden transplantierten Zellen hämatopoetische Stammzellen, migrieren diese in das Knochenmark der Mäuse. Sie beginnen sich zu teilen und multipotente Progenitoren zu produzieren, die sich in die reifen Blutzellen differenzieren. Die Blutzellen der verschiedenen Linien kann man dann mit Hilfe von humanspezifischen monoklonalen Antikörpern nachweisen und sie von den sich erholenden murinen Blutzellen unterscheiden. So kann man nachweisen, dass die transplantierten Stammzellen multipotent waren. Wenn verschiedene humane Blutzelllinien nachweisbar sind, spricht man auch von „Multilineage-Engraftment“ oder Repopulation.

Ob die Stammzellen zur Selbsterneuerung fähig sind, lässt sich dadurch beweisen, dass die übertragenen Zellen langfristig zur Hämatopoese beitragen. Sind menschliche Zellen nur für einen Zeitraum von weniger als zwei Monaten im Blut der Mäuse nachweisbar („short-term Engraftment“), geht man davon aus, dass die transplantierten Zellen sich nicht selbst erneuern konnten und nur aus kommitierten Progenitoren mit begrenzter Teilungsfähigkeit bestanden.

Werden in den Mäusen humane Zellen länger als zwei Monate nachgewiesen, waren in der transplantierten Zellpopulation sich selbst erneuernde Stammzellen vorhanden (Eaves et al., 1997). Das bezeichnet man auch als „long term Engraftment“.

Mit Hilfe des Transplantationsassays ist auch eine Bestimmung der Frequenz der repopulierenden hämatopoetischen Stammzellen in der Ausgangszellpopulation möglich. Dazu transplantiert man eine logarithmische Verdünnungsreihe verschiedener Zellzahlen in je 10 Mäuse und berechnet aus der Anzahl der „long-term Engraftments“ der jeweiligen Verdünnungsstufe die Frequenz der repopulierenden Stammzellen (Szilvassy et al., 1990).

### **2.5.2 IN-VITRO ANALYSE DES KOLONIEBILDENDEN POTENZIALS**

Die Bestimmung kolonieformender Einheiten ist eine Methode zur Analyse der Proliferations- und der Differenzierungskapazität von Stammzellen. Das Prinzip besteht darin, eine Einzelzellsuspension von zu analysierenden Zellen in einem durchsichtigen, semisoliden Medium wie Methylzellulose zu immobilisieren. Dadurch kann man die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der klonalen Abkömmlinge dieser einzelnen Zellen beobachten, ohne dass die Zellen durch Sedimentation oder Migration ihre Position verändern können. Dem semisoliden Medium kann man Wachstumsfaktoren zusetzen, um die Differenzierung der Zellen in die zu untersuchende Richtung zu induzieren. Die entstehenden Kolonien sind makroskopisch sichtbare Anhäufungen von Vorläuferzellen und ihren Nachkommen (Williams-DA, 1995).

Im hämatopoetischen System wurden die Zytokine und die Morphologie der verschiedenen hämatopoetischen Kolonien standardisiert. Man untersucht die Morphologie der entstandenen Kolonien mit Hilfe eines Umkehrmikroskops auf CFU-E, CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-M und CFU-G.

CFU-E sind 1-2 Anhäufungen hämoglobinisierter Erythrozyten, CFU-GEMM sind Kolonien der unreifsten myeloischen Zellen, der CMPs (s. Abbildung 5, S. 15). Diese Kolonien enthalten Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten. CFU-GM enthalten Granulozyten und Monozyten, CFU-G und -M nur Granulozyten oder Monozyten (Williams-DA, 1995). Man kann also anhand der

Zahl Kolonien feststellen, wie viele proliferationskompetente Progenitoren welcher myeloischen Zellreihe in der ausgesäten Zellpopulation vorhanden waren.

Anhand der Morphologie ist es auch möglich, endotheliale Kolonien zu identifizieren. Diese Kolonien werden von Endothelprogenitorzellen gebildet und können nach den von uns und anderen publizierten Kriterien eindeutig zugeordnet werden (Asahara et al., 1997; Gehling et al., 2000).

## **2.6 CHARAKTERISIERUNG HÄMATOPOETISCHER STAMMZELLEN II: ZELLOBERFLÄCHENMARKER**

Humane hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen werden seit langer Zeit durch Expression des Zelloberflächenmarkers CD34 charakterisiert und mittels immunologischer Aufreinigungstechniken isoliert (de Wynter et al., 1995; Krause et al., 1996). CD34 ist ein Typ I Transmembran-Protein mit bislang ungeklärter Funktion und gehört zur Familie der Sialomucine. CD34 wird auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, auf Endothelzellen und auf embryonalen Fibroblasten exprimiert (Brown et al., 1991; Fina et al., 1990). Die CD34-Expression ist auf unreifen Zellen am stärksten und nimmt ab, je weiter sich die Zellen differenzieren. CD34 ist aber auch noch auf relativ weit differenzierten Progenitoren wie Prä-B-Zellen, CFU-E und CFU-G vorhanden. Ausdifferenzierte hämatopoetische Zellen sind CD34 negativ ( $CD34^-$ ) (Civin et al., 1987). Der Anteil der CD34 positiven Zellen ( $CD34^+$ ) beträgt im peripheren Blut <0,5% und im Knochenmark 1,5%. Unter dem Einfluss von G-CSF werden die hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert. Der Anteil der  $CD34^+$  Zellen beträgt dann 1,75% (Civin et al., 1987; de Wynter et al., 1998). Humane  $CD34^+$  Zellen können die Hämatopoese in myeloabladierten Menschen und Mäusen vollständig rekonstituieren (Berenson et al., 1991).  $CD34^+$  Stammzellen werden zurzeit klinisch für Knochenmark-transplantationen und Gentherapiestudien benutzt (Krause et al., 1996).

Eine  $CD34^+$  Zellpopulation beinhaltet jedoch eine Mischung von Stamm- und Progenitorzellen mit unterschiedlichen Differenzierungspotenzialen, und die unreifen multipotenten Stammzellen machen nur einen sehr kleinen Anteil von ca. 0,01% aus. Es wurde in einer neueren Studie durch Rekonstitution der Langzeitmaushämatopoese durch eine einzelne  $CD34^-$  Zelle gezeigt, dass unreife

multipotente Stammzellen existieren, die CD34 nicht exprimieren (Bhatia et al., 1998; Osawa et al., 1996). Die Frequenz der repopulierenden Stammzellen war jedoch viel geringer als in der CD34<sup>+</sup> Population und zeigte somit ähnliche Eigenschaften wie die extrem seltene multipotente hämatopoetische Stammzelle (Bhatia et al., 1998).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Mehrzahl der ruhenden hämatopoetischen Stammzellen in murinem Knochenmark CD34 nicht oder nur schwach exprimierte, dass die Expression aber nach Aktivierung heraufreguliert wurde (Sato et al., 1999). Daraus folgt, dass die CD34-Expression möglicherweise dynamisch ist und mit dem physiologischen Status des Organismus korreliert (Goodell, 1999). Die CD34 negativen Stammzellen sind jedoch schwierig zu untersuchen, da sie von einem großen Überschuss an differenzierten, auch CD34 negativen Zellen maskiert werden. Deshalb wurde nach weiteren Zelloberflächenmolekülen gesucht, um hämatopoetische Stammzellen genauer zu charakterisieren.

1997 wurde mit CD133 (AC133) ein neuer Zelloberflächenmarker für hämatopoetische Stammzellen entdeckt (Yin et al., 1997). CD133 wird hauptsächlich auf Zellen exprimiert, die eine starke Expression von CD34 zeigen. Es wurden jedoch auch CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> Zellen beschrieben, die Mäuse langzeitrepopulieren konnten (Gallacher et al., 2000). Im Knochenmark beträgt der Anteil der Zellen, die CD133 auf ihrer Oberfläche exprimieren, 0,5% und im mobilisierten, peripheren Blut 1,4%. Der Anteil der CD133<sup>+</sup> Zellen in der Population der CD34<sup>+</sup> Zellen beträgt im Knochenmark 36% und im mobilisierten peripheren Blut 75% (de Wynter et al., 1998).

CD133 ist ein 120 kDa 5-Helix-Transmembranglykoprotein, das von hämatopoetischen Stammzellen und Endothelprogenitorzellen exprimiert wird (Miraglia et al., 1997). Unsere Gruppe konnte zeigen, dass aus dem peripheren Blut isolierte CD133<sup>+</sup> Zellen sich in-vitro in funktionale Endothelzellen differenzieren können (Gehling et al., 2000).

Im Unterschied zu CD34 wird CD133 nicht von den oben beschriebenen linienkommitierten Progenitoren exprimiert. CD133 wird jedoch außerdem auf Stamm- und Progenitorzellen nicht hämatopoetischer Gewebe wie z.B. neuronalen Stammzellen, embryonalen Stammzellen und adulten mesenchymalen

multipotenten Progenitoren exprimiert, die alle CD34 negativ sind (Jiang et al., 2002; Kaufman et al., 2001; Uchida et al., 2000). Diese CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> Zellen haben ein großes Differenzierungspotenzial für die Bildung verschiedener Gewebe. Sie können sich z.B. in neuronale Zellen, quergestreifte und glatte Muskelzellen sowie Leberzellen und Lungenzellen differenzieren, die aus verschiedenen Keimblättern stammen (Verfaillie et al., 2003). Aus diesen Daten lässt sich eine mögliche Bedeutung der CD133<sup>+</sup> Zellen für zukünftige zellbasierte Therapieformen z.B. bei Myokardinfarkten oder Morbus Parkinson ableiten.

Ein weiteres, wichtiges Zelloberflächenmolekül von hämatopoetischen Stammzellen ist CD117 (c-kit). C-kit ist ein 145 kDa schweres Molekül aus der Typ III Rezeptortyrosinkinase-Familie. Der humane c-kit Rezeptor wird von benignen und malignen hämatopoetischen Progenitorzellen sowie von Endothelzellen und Neuronen exprimiert (Ashman et al., 1991; Broudy, 1997; Broudy et al., 1992). In Mäusen wird c-kit von unreifen, multipotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet, die sowohl die Kurz- als auch die Langzeithämatopoese rekonstituieren können (Yamamoto et al., 1996).

Der Ligand von c-kit ist das Cytokin Stem Cell Factor (SCF) (Hiraoka et al., 1997). SCF wird von hämatopoetischen Stammzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und epithelialen Zellen produziert.

C-kit und sein Ligand sind entscheidend für die Entwicklung der Hämatopoese. Knock-out Mäuse für c-kit oder SCF sterben pränatal an einer makrozytären Anämie. Wenn erwachsene Tiere mit anti-c-kit Antikörpern behandelt werden, resultiert eine Panzytopenie in Knochenmark und peripherem Blut. Daraus folgt, dass dieses Rezeptor-Ligandsystem eine wichtige Rolle bei der adulten Hämatopoese spielt (Broudy, 1997).

Interessanterweise scheint es einen fundamentalen Unterschied zwischen der Rolle der c-kit-SCF Interaktion bei Menschen und Mäusen zu geben. In Mäusen stimuliert SCF das Überleben von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen und c-kit wird in diesen Zellen stark exprimiert (Keller et al., 1995).

Im humanen System scheint es umgekehrt zu sein. Neuere Arbeiten zeigen, dass humane, langzeitrepopulierende Stammzellen wenig oder kein c-kit exprimieren und dass ihr Überleben auch nicht von c-kit gefördert wird. Das Zelloberflächenmolekül FLT3 und sein Ligand FLT3L scheinen eine c-kit

entgegengesetzte Wirkung auf multipotente Stammzellen bei Maus und Mensch zu haben. Sie werden im Folgenden beschrieben (Kawashima et al., 1996; Sitnicka et al., 2003).

FLT3 gehört wie c-kit zur Familie der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen und weist eine 13%ige Sequenzidentität mit c-kit auf. FLT3 wird beim Menschen ausschließlich im hämatopoetischen System vor allem auf unreifen Vorläuferzellen und Monozyten sowie auf malignen Zellen exprimiert (Rosnet et al., 1996; Zeigler et al., 1994). Es wurde gefunden, dass die Mehrheit der CD34<sup>+</sup> Zellen FLT3 koexprimiert (Rappold et al., 1997). FLT3L kann die Zahl unreifer multipotenter Stammzellen um den Faktor 30 erhöhen (Petzer et al., 1996). Bei Mäusen und Menschen scheint FLT3-FLT3L eine zu c-kit entgegengesetzte Rolle zu spielen.

In Mäusen wurde gezeigt, dass die Heraufregulation von FLT3 zu einem Verlust der Selbsterneuerungsfähigkeit der hämatopoetischen Stammzellen führt und dass SCF und nicht FLT3L das Überleben langzeitrepopulierender Zellen fördert (Adolfsson et al., 2001; Christensen und Weissman, 2001; Keller et al., 1995).

Im Gegensatz dazu exprimieren menschliche Multilineage-rekonstituierende Zellen FLT3 und werden durch FLT3L in ihrem Überleben gefördert. Sie exprimieren im Ruhezustand kein oder wenig c-kit. SCF ist außerdem beim Menschen deutlich weniger effizient in der Förderung des Überlebens dieser primitiven Zellen (Sitnicka et al., 2003).

Ein weiteres Zelloberflächenmolekül, das humane, unreife, multipotente hämatopoetische Stammzellen sowie aktivierte Endothelzellen kennzeichnet, ist CD90 (Craig et al., 1993). CD90 ist ein Zelloberflächenmolekül ohne zytoplasmatische Anteile, das durch einen Phosphatidylinositolanker in der Plasmamembran befestigt ist. Es gibt aus dem murinen System Hinweise darauf, dass die Expression von CD90 parallel zur Differenzierung von Stammzellen herunterreguliert wird (Williams et al., 1985). Außerdem wurde gezeigt, dass CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> Zellen sich in humanen, fötalen Knochen in NOD-SCID Mäusen ansiedeln und die Mäuse dadurch repopulieren konnten (Baum et al., 1992). Im menschlichen System wurde belegt, dass die Anzahl von CD34<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut der beste Prediktor für die Erholung der Thrombopoese nach autologer Stammzelltransplantation war (Sumikuma et al., 2002). Ca. 25% der

CD34<sup>+</sup> Zellen koexprimierten CD90. Nur sehr wenige Zellen waren gleichzeitig positiv für c-kit und CD90 (Craig et al., 1993).

CD7 ist ein 40 kDa schweres Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Der Ligand für CD7 wurde noch nicht identifiziert. CD7 ist einer der frühesten, bekannten Marker in der Entwicklung von NK- und T-Zellen (Shortman und Wu, 1996; Storms et al., 2000). Eine neuere Arbeit identifizierte die CD7<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellpopulation als primitive klonogene Progenitorpopulation, die B-, NK- und dendritische Zellen generieren konnte. Aus den CD7<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellen konnten sich keine erythroiden oder myeloiden Zellen differenzieren, was zusätzlich dafür spricht, dass es sich bei diesen Zellen um unreife, lymphoid determinierte Progenitoren handelt (Hao et al., 2001). In dieser Zellpopulation sind die unreifsten bisher beschriebenen lymphoiden Progenitorzellen enthalten, da die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) nicht exprimiert wird. Die TdT-Expression wurde bis zur Beschreibung der CD7<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> Zellpopulation als frühester Marker für die lymphoide Entwicklung angesehen.

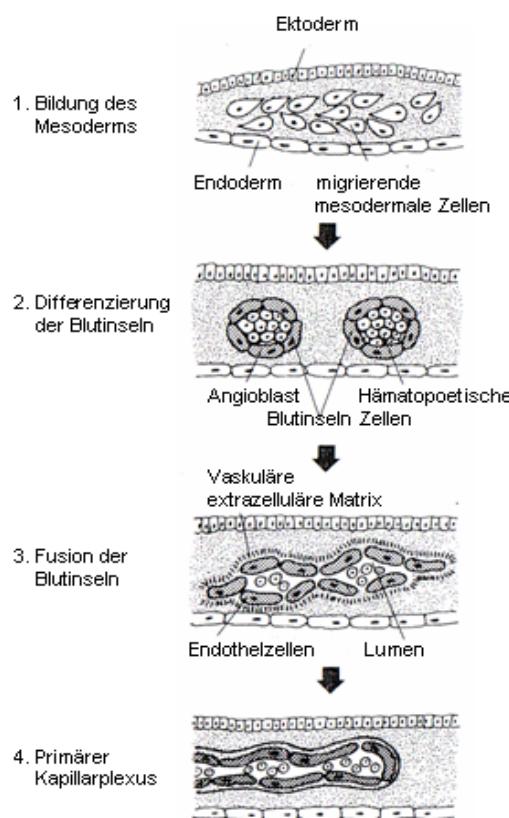
## **2.7 PHÄNOTYPISCHE UND ONTOGENETISCHE ÜBERLAPPUNGEN ZWISCHEN HÄMATOPOETISCHEN UND ENDOTHELIALEN ZELLEN: HINWEISE AUF DIE EXISTENZ VON POSTNATALEN HÄMANGIOBLASTEN**

Das Konzept einer gemeinsamen Ursprungszelle für Blut- und Endothelzellen wurde vor mehr als 80 Jahren erstmals von Sabin formuliert. Diese Forscherin hatte in frühen Hühnerembryonen die Entstehung von Blut und Blutgefäßen aus dem primitiven Mesoderm beobachtet. Dabei bildeten sich in der proliferierenden Zellmasse Vakuolen, deren zentrale Zellen zum Lumen von Blutgefäßen und zu den blutbildenden Zellen regredierten und deren randständige Zellen (Angioblasten) die Blutgefäße auskleideten. Diese Zellformation wurde Blutinsel genannt. Die Blutinseln verschmolzen im weiteren Verlauf zum ersten vaskulären Netz des sich entwickelnden Embryos (Sabin, 1920).

Die Blutbildung bei Säugetieren beginnt im fötalen Dottersack. Ultrastrukturelle Aufnahmen von Mausföten zeigten, dass mesodermale Zellen im extraembryonalen Mesoderm und Allantois an den Stellen zukünftiger Blutinseln stark proliferieren. Diese Veränderungen treten bei Mäusen am 8. und bei Menschen am 16. postkoitalen Tag auf. Die peripheren Angioblasten

differenzieren sich in der weiteren Entwicklung in Endothelzellen und die zentralen Zellen in primitive, multipotente hämatopoetische Zellen. Wie bei den Hühnerembryonen konfluieren diese Blutinseln zum ersten Gefäßnetz. Die hämatopoetischen Zellen differenzieren sich in der Maus vor allem in Erythrozyten (Haar und Ackerman, 1971; Moore und Metcalf, 1970).

In der Abbildung 6 werden die beschriebenen Vorgänge der primären Blut- und Blutgefäßbildung veranschaulicht.



**Abbildung 6: Vaskulogenese und Hämatopoiese (Risau und Flamme, 1995).** Zunächst entwickeln sich die Blutinseln aus migrierenden und proliferierenden mesodermalen Zellen. Die peripheren Zellen der Blutinseln, die als Angioblasten bezeichnet werden, differenzieren sich in Blutgefäßzellen. Aus den zentralen Zellen der Blutinseln entwickeln sich die Blutzellen. Die Blutinseln konfluieren anschließend zum ersten Gefäßnetz des sich entwickelnden Embryos.

Parallel zur Entstehung der hämatopoetischen Stammzellen im Dottersack werden blutbildende Zellen auch in der intra-embryonalen paraaortalen Splanchnopleura (p-Sp) und der Aorta-Gonaden-Mesonephros Region (AGM-Region) der Maus gebildet. Auch hier zeigen die hämatopoetischen Stammzellen eine enge

Assoziation mit den Endothelzellen der dorsalen Aorta (de Brujin et al., 2002; Godin et al., 1995). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese eines hämatogenen Endothels, das heißt von gemeinsamen Ursprungszellen für hämatopoetische und endotheliale Zellen.

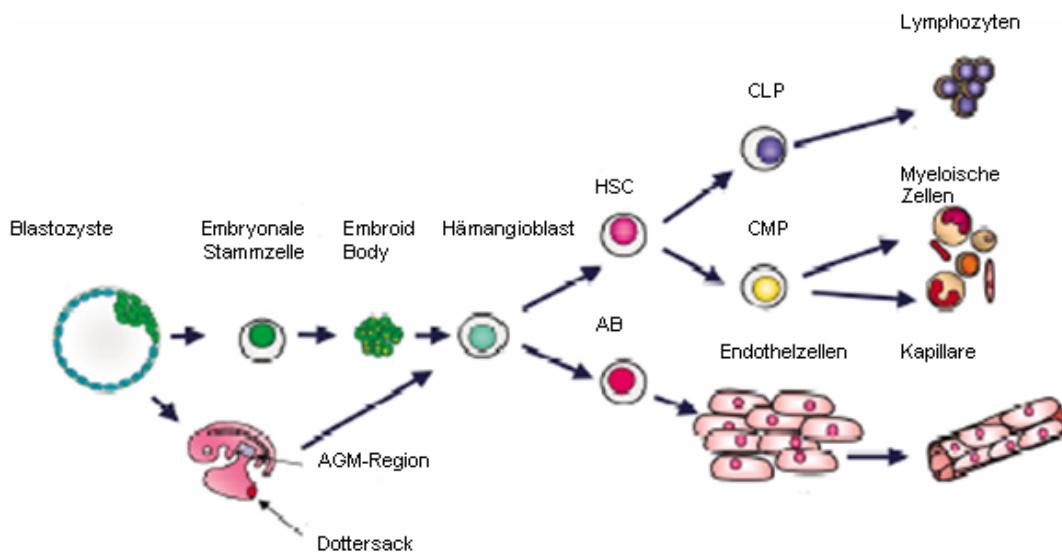
Diese Hypothese wurde durch Markierung der Endothelzellen mit Dil-konjugiertem LDL und dem Nachweis dieser Markierung in hämatopoetischen Zellen bewiesen (Jaffredo et al., 1998). Untersuchungen an frühen menschlichen Embryonen zeigten ebenfalls endotheliale Zellen, die sich in hämatopoetische Zellen differenzieren konnten (Tavian et al., 1996).

Damit wurde bei Menschen, Mäusen und Vögeln die Existenz von Hämangioblasten, also gemeinsamer Vorläuferzellen für Blut- und Blutgefäßzellen, während der Embryonalentwicklung in-vivo gezeigt.

Nach 10,5 Tagen in Mäusen und nach 6 Wochen in Menschen regredieren die Blutinseln, und der Hauptbildungsort der Hämatopoese entsteht in der fötalen Leber. Die hämatopoetischen Stammzellen differenzieren sich immer noch hauptsächlich in Erythrozyten, obwohl auch myeloide Progenitoren in der Leber sowie Blutplättchen und Granulozyten in der Zirkulation nachweisbar sind. Damit findet die Hämatopoese hauptsächlich extravaskulär statt (Jones, 1970).

Der Wechsel der Hämatopoese an ihren endgültigen Ort, beim Menschen das Knochenmark und bei Mäusen Milz und Knochenmark, beginnt beim Menschen in der 8. Gestationswoche und erreicht im 5. Monat sein Maximum. Dann sind alle Hohlräume der Knochen mit Blutzellen gefüllt, der Fötus kann aber bei Bedarf auch noch zusätzlich die extramedulläre Hämatopoese in Leber und Milz reaktivieren (Hudson, 1965).

Da die Analyse von Hämangioblasten durch die extrem geringen Zellzahlen während der Embryonalentwicklung erschwert wird, wurden ES-Zelllinien als Modellsystem benutzt. Aus den ES-Zellen lassen sich dreidimensionale Gebilde, so genannte Embroid-bodies differenzieren, die unter bestimmten Kulturbedingungen sowohl hämatopoetische als auch endotheliale Zellen bilden können. Diese Zellen könnten das in-vitro Äquivalent zum Hämangioblasten darstellen (Kennedy et al., 1997; Risau et al., 1988). Die Abbildung 7 veranschaulicht die Entstehung und das Differenzierungspotenzial von embryonalen Hämangioblasten.



**Abbildung 7: Entstehung von embryonalen Hämangioblasten (Moore, 2002).** Embryonale Hämangioblasten entstehen in-vivo in der AGM-Region und im Dottersack. Sie können sich aber auch in-vitro aus Kulturen von embryonalen Stammzellen über die Zwischenstufen der „Embroid Body“ differenzieren. Aus den embryonalen Hämangioblasten differenzieren sich über die Angioblasten und hämatopoetischen Stammzellen anschließend die reifen Blut- und Blutgefäßzellen (AGM, Aorta-Gonaden-Mesonephros; HSC, Hämatopoetische Stammzelle; CLP, Common Lymphoid Precursor; CMP, Common Myeloid Precursor; AB, Angioblast).

Am ES-Zellmodell und mit Hilfe von Studien an fötalen Mäusen wurde die Regulation der Differenzierung von Hämangioblasten auch auf molekularer Ebene untersucht. Bei diesen Experimenten wurden verschiedene Moleküle identifiziert, die eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung embryonaler Hämangioblasten spielen.

Einige wichtige werden im Folgenden beschrieben: Das Zelloberflächenmolekül Kinase Insert Domain Receptor (KDR, VEGFR2, Flk-1) ist eine Rezeptortyrosinkinase mit dem Liganden Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). KDR Knock-out Mäuse starben in utero zwischen dem 8. und 9. Gestationstag wegen fehlender Endothelzellen und Blutinseln. Die Studie von Shalaby et al. zeigt die entscheidende Bedeutung von KDR bei der Entwicklung fötaler Hämangioblasten (Shalaby et al., 1995). Markierte und in Wildtyp-Embryos transplantierte KDR<sup>-/-</sup> ES-Zellen konnten nicht zur Hämatopoiese und

Blutgefäßbildung beitragen, was die entscheidende Rolle von KDR bestätigt (Shalaby et al., 1997).

VEGF spielt eine ebenso wichtige Rolle bei der Entwicklung des Blutes und der Blutgefäße. Der Verlust eines VEGF-Allels führte wie das Ausschalten des VEGF Rezeptors KDR zum Tod der Knock-out Mäuse wegen fehlender Blutinselbildung. Diese Daten zeigen eine enge, dosisabhängige Regulation der Hämangioblasten durch VEGF (Damert et al., 2002).

Das Stem Cell Leukemia (SCL) Genprodukt gehört zur Familie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren, das von unreifen hämatopoetischen, erythroiden, megakaryozytären, endothelialen und Mastzellen exprimiert wird (Begley et al., 1989). SCL-defiziente Mäuse können keine hämatopoetischen Zellen im Dottersack bilden. Obwohl diese Tiere ein primäres vaskuläres Netzwerk besitzen, zeigen sie, wenn die Hämatopoese durch Transplantation von SCL<sup>+/+</sup> Zellen induziert wird, dysfunktionale Gefäße (Shivdasani et al., 1995; Visvader et al., 1998). Diese Ergebnisse implizieren eine wichtige Rolle von SCL bei der Entwicklung der Hämatopoese und bei der Angiogenese, also der Remodellierung bereits existierender Blutgefäße. Außerdem gibt es Hinweise auf einen engen Zusammenhang zwischen der Expression von KDR und SCL, da gezeigt werden konnte, dass KDR<sup>-/-</sup> Embryonen auch kein SCL exprimieren (Ema et al., 2003).

Um den zeitlichen Zusammenhang zwischen der Expression von KDR und SCL zu untersuchen, generierten Chung et al. eine ES-Zelllinie, bei der ein defektes, aber an der Zelloberfläche nachweisbares CD4 als Reportergen in ein Allel des SCL-Gens integriert wurde. Dadurch konnte verfolgt werden, wann die sich entwickelnden Hämangioblasten welches der beiden Gene angeschaltet hatten. Es zeigte sich, dass sich zunächst KDR<sup>+</sup>SCL<sup>-</sup> Zellen entwickelten, die dann in KDR<sup>+</sup>SCL<sup>+</sup> Zellen differenzierten. Aus diesen Zellen entwickelten sich KDR<sup>+</sup>SCL<sup>-</sup> Endothelzellen und KDR<sup>-</sup>SCL<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen. Durch die Experimente von Chung et al. wurde die KDR<sup>+</sup>SCL<sup>+</sup> Zellpopulation als embryonaler Hämangioblast definiert (Chung et al., 2002). Aus ES-Zellen differenzierte Hämangioblasten sind außerdem hauptsächlich in KDR<sup>+</sup>SCL<sup>+</sup> Zellpopulationen vorhanden und VEGF-abhängig, was die wichtige Rolle dieses Zytokins für Hämatopoese und Vaskulogenese bestätigt (Choi et al., 1998).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von SCL bei Zebrafischen zu einer Überproduktion von Hämangioblasten führte. Dies bestätigte die entscheidende Rolle dieses Transkriptionsfaktors für den Hämangioblasten (Gering et al., 1998).

Ein weiteres Gen, das von primitiven hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen koexprimiert wird, ist der Zinc-Finger Transkriptionsfaktor GATA-Binding Protein 2 (GATA-2), der in einem ähnlichen Zellspektrum wie SCL gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, dass GATA-2 eine wichtige Rolle für die Proliferation und das Überleben von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen spielt. GATA-2<sup>-/-</sup> Knock-out Mäuse starben intrauterin am 10. postkoitalen Tag an Anämie, und Nachkommen von Mausblastozysten mit eingebrachten GATA-2<sup>-/-</sup> ES-Zellen zeigten einen Defekt in allen hämatopoetischen Linien (Tsai und Orkin, 1997).

Wie SCL wird GATA-2 in der AGM und P-Sp Region exprimiert, in denen sich, wie oben beschrieben, hämatopoetische Zellen aus Hämangioblasten differenzieren. Sowohl das KDR-Gen als auch das SCL-Gen enthält in seinen regulatorischen Sequenzen GATA-Bindungsstellen. Da KDR und SCL in den frühen Hämangioblasten der AGM und P-Sp Regionen exprimiert werden und der Phänotyp der GATA-2 Knock-out Maus dem der KDR- und SCL-defizienten Embryonen ähnelt, ist eine Regulation von KDR und SCL durch GATA-2 wahrscheinlich (Elefanty et al., 1999; Gottgens et al., 2002; Kappel et al., 2000).

In einer neueren Arbeit konnte durch Einbringen (Knock-in) von GFP in den GATA-2 Locus gezeigt werden, dass GATA-2 in CD45<sup>-</sup> hämatogenen Endothelzellen der AGM-Region exprimiert wird. Überexpression von GATA-2 in diesen Zellen blockierte ihre Differenzierung in CD45<sup>+</sup> hämatopoetische Zellen. Dies legt nahe, dass GATA-2 den hämangioblastischen Phänotyp dieser Zellen aufrechterhalten kann (Minegishi et al., 2003).

Zusammenfassend konnte durch die beschriebenen Experimente gezeigt werden, dass GATA-2 in Hämangioblasten exprimiert wird, an der Regulation von SCL und KDR beteiligt ist und eine Ausdifferenzierung dieser Zellen verhindern kann.

Die Existenz von Hämangioblasten in embryonalen Organismen wurde durch die oben zusammengefassten Daten vieler Arbeitsgruppen bewiesen.

Seit einigen Jahren gibt es auch immer mehr Hinweise auf die Persistenz von Hämangioblasten in adulten Organismen.

Hämatopoetische Zellen und endotheliale Zellen exprimieren viele gemeinsame Zelloberflächenmoleküle und Transkriptionsfaktoren. In den Tabellen 2 und 3 ist dieses überlappende Expressionsspektrum im Überblick dargestellt.

**Tabelle 2: Gemeinsame Expression von Zelloberflächenmolekülen durch hämatopoetische und endotheliale Zellen (EC, Endothelzellen; HSC, hämatopoetische Stammzellen; vWF, von Willebrand Faktor; Ulex, Ulex europaeus Rezeptor).**

Marker	Synonym	EC	Hämatopoetische Zellen	Referenzen
CD14		+	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile	(Jersmann et al., 2001; Schmeisser und Strasser, 2002)
CD31	PECAM-1	+	HSC, Blutplättchen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen	(Rafii, 2000; Schmeisser und Strasser, 2002)
CD34		+	HSC	(Rafii, 2000; Schmeisser und Strasser, 2002)
CD45		-	Alle Leukozyten	(Kishimoto et al., 1998)
CD105	Endoglin	+	HSC, aktivierte Monozyten und Makrophagen, erythroide Vorläuferzellen	(Kishimoto et al., 1998; Mancuso et al., 2001; Pierelli et al., 2000)
CD106	VCAM-1	+	Dendritische Zellen, Makrophagen	(Kishimoto et al., 1998; Mancuso et al., 2001)
CD133		+	HSC	(Rafii, 2000; Schmeisser und Strasser, 2002)
CD144	VE-Cadherin	+	-	(Kishimoto et al., 1998; Rafii, 2000; Schmeisser und Strasser, 2002)
CD146		+	T-Zellen	(Kishimoto et al., 1998)
KDR	VEGFR-2	+	HSC, Hämangioblasten	(Rafii, 2000; Schmeisser und Strasser, 2002)
vWF		+	Monozyten	Rafii 2003
Ulex		+	Hämatopoetische Zellen	(Rafii und Lyden, 2003)

**Tabelle 3: Gemeinsame Expression von Transkriptionsfaktoren durch hämatopoetische und endotheliale Zellen (EC, Endothelzellen; HSC, hämatopoetische Stammzellen; SCL, Stem Cell Leukemia; GATA-2, GATA Binding Protein 2).**

Marker	Synonym	EC	Hämatopoetische Zellen	Referenzen
SCL		+	HSC, Hämangioblasten, erythroide, megakaryozytäre Progenitoren, Mastzellen	(Begley et al., 1989)
GATA-2		+	HSC, Hämangioblasten erythroide, megakaryozytäre Progenitoren, Mastzellen	(Tsai und Orkin, 1997)

Mit dem Auftreten von Blutinseln im sich entwickelnden Embryo entsteht, wie auf S. 23 ff. beschrieben, durch Differenzierung von Endothelzellen aus Hämangioblasten das erste primitive, vaskuläre Netz. Diesen Vorgang bezeichnet man als Vaskulogenese (Risau und Flamme, 1995; Risau et al., 1988).

Die weitere Reifung und Modellierung dieses Gefäßnetzes erfolgt durch Aussprossen neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen, was man als Angiogenese bezeichnet (Folkman, 1995; Folkman und Shing, 1992).

Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Vaskulogenese auf die frühe Embryonalentwicklung beschränkt sei und dass die Veränderungen adulter Blutgefäße ausschließlich durch Angiogenese erfolgten.

Dieses Dogma wird durch zunehmende Berichte in der Literatur erschüttert, die implizieren, dass die Vaskulogenese an der Neubildung von Blutgefäßen und der Modifikation bereits existierender Gefäße beteiligt ist. Stump et al. entdeckten als erste, dass es im peripheren Blut zirkulierende Endothelzellen gibt, die Gefäßprothesen besiedeln können (Stump et al., 1963).

Über 20 Jahre später isolierten Ashara et al., basierend auf der Zelloberflächenexpression von KDR und CD34, die ersten Endothelprogenitorzellen aus dem peripheren Blut (Asahara et al., 1997). Wie auch aus Hämatopoetische Zellen und endotheliale Zellen exprimieren viele gemeinsame Zelloberflächenmoleküle und Transkriptionsfaktoren. In den Tabellen 2 und 3 ist dieses überlappende Expressionsspektrum im Überblick dargestellt.

Tabelle 2 zu ersehen ist, exprimieren Endothelzellen und hämatopoetische Stammzellen diese beiden Zelloberflächenmoleküle. Die CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> Zellen differenzierten sich in-vitro in Endothelzellen mit typischer Morphologie und den Zelloberflächenmarkern von Willebrand Faktor (vWF), Ulex europaeus Rezeptor (Ulex), CD31 sowie der für Endothelzellen typischen Aufnahme von Dil-konjugierten LDL-Partikeln.

In-vivo integrierten sich die aus CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> Stammzellen differenzierten Endothelzellen in die neu gebildeten Blutgefäße einer durch Abbinden ischämischen Extremität der Maus. Diese Ergebnisse waren der erste Beweis dafür, dass sich im peripheren Blut zirkulierende Endothelzellen an der Bildung neuer Blutgefäße durch Vaskulogenese beteiligen können. Sie sind jedoch mit einem Anteil von 0,01% an den mononukleären Zellen extrem selten (Asahara et al., 1997).

Die Herkunft dieser Zellen wurde von unserer Gruppe und anderen aufgeklärt. Wir konnten zeigen, dass mobilisierte CD133<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen sich in-vitro in funktionale Endothelzellen differenzieren können (Gehling et al., 2000).

Eine andere Gruppe identifizierte funktionelle Endothelprogenitoren als Population von CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> Zellen (Peichev et al., 2000). Shi et al. zeigten, dass CD34<sup>+</sup> Zellen aus Knochenmark und peripherem Blut sich in Endothelzellen differenzierten und dass die genetisch markierten, transplantierten Knochenmarkzellen eines Kaninchens eine Gefäßprothese in einem anderen Kaninchen endothelialisieren konnten (Shi et al., 1998). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass transplantierte Knochenmarkzellen sich an der physiologischen Neubildung von Blutgefäßen im Reproduktionstrakt von weiblichen Mäusen und an der pathologischen Gefäßneubildung, z.B. bei Tumoren, beteiligten (Asahara et al., 1999).

Die wichtige Rolle von Endothelprogenitoren bei der Blutgefäßbildung von Tumoren konnte in-vivo durch Transplantation von Wildtyp-Knochenmark in tumorresistente Id1-Id3-defiziente Mäuse gezeigt werden. Diese Mutation hatte zur Folge, dass die Mäuse nicht zur Neubildung von Blutgefäßen in der Lage waren. Durch die Transplantation des Wildtyp-Knochenmarks wurde die Tumorblutgefäßbildung durch Vaskulogenese wiederhergestellt (Lyden et al., 2001).

Beim Menschen zeigte eine Arbeit von Gunsilius et al., dass Endothelzellen im Knochenmark von CML-Patienten die pathognomonische Bcr-Abl Translokation aufwiesen. Da die CML eine maligne Erkrankung unreifer hämatopoetischer Stammzellen ist, wurde dadurch auch beim Menschen in-vivo bewiesen, dass hämatopoetische Stammzellen sich in Endothelzellen differenzieren können (Gunsilius et al., 2000).

Durch die oben beschriebenen Experimente wurde der Ursprung zumindest eines Teils der im adulten Organismus vorhandenen Endothelvorläuferzellen im Knochenmark nachgewiesen.

Neuere Arbeiten konnten auf Einzelzellebene zeigen, dass aus dem Knochenmark stammende Progenitorzellen sich in funktionale Blutgefäße integrieren können. Grant et al. zeigten z.B. die Integration der Nachkommen einer einzelnen GFP-markierten c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> Knochenmarkzelle in die retinalen Blutgefäße von Mäusen nach Laser-induzierten Verletzungen (Grant et al., 2002).

Eine andere Gruppe zeigte die Integration der Nachkommen einer einzelnen transplantierten Knochenmarkzelle in die Blutgefäße verschiedener muriner Gewebe nach Bestrahlung. Diese Nachkommen machten bis zu 5% der Endothelzellen des Rezipienten aus. Außerdem wurden Nachkommen der einzelnen transplantierten Zelle unter den Blutzellen des Rezipienten nachgewiesen (Bailey et al., 2004). Damit wurde erstmals auf klonaler Ebene die Existenz von Hämangioblasten in der adulten Maus bestätigt. Bis heute fehlt jedoch der Nachweis des postnatalen Hämangioblasten des Menschen auf Einzelzellebene.

Der Nachweis der Existenz von Endothelprogenitorzellen im adulten Organismus, die sich durch Vaskulogenese an der Blutgefäßneubildung unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen beteiligen können, hat vielfältige klinische Anwendungsmöglichkeiten. So konnte bereits gezeigt werden, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen an der Blutgefäßneubildung bei der Wundheilung, nach Myokardinfarkt, bei der Arteriosklerose, bei der Revaskularisierung von Organen und Extremitäten nach Ischämien und beim Tumorwachstum beteiligt sind (Asahara et al., 1999; Davidoff et al., 2001; Kalka et al., 2000; Kocher et al., 2001; Orlic et al., 2001; Rafii, 2000; Rafii und Lyden, 2003; Sata et al., 2002; Takahashi et al., 1999).

Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Zellen werden derzeit durch die geringe Frequenz der zirkulierenden Endothelprogenitorzellen limitiert. Ein Beispiel einer klinischen Anwendung liegt in der Therapie des Herzinfarktes. Hier injizierten einige Gruppen die Gesamtpopulation der Knochenmarkzellen in den infarzierten Herzmuskel. Andere verwendeten aufgereinigte CD133<sup>+</sup> Stammzellen.

Als Ergebnisse ließen sich ein verbesserter Blutfluss und eine verbesserte linksventrikuläre Funktion nachweisen (Stamm et al., 2003; Tse et al., 2003). Bis heute liegen jedoch noch keine ausgewerteten Langzeitstudien vor.

Von entscheidender Bedeutung für eine Behandlung von Patienten mit Stammzellen ist es, ex-vivo Kulturbedingungen zu entwickeln, mit deren Hilfe ausreichend viele Endothelprogenitorzellen für eine klinische Anwendung gewonnen werden können. Außerdem ist aber auch eine weitere phänotypische Charakterisierung der verwendeten Zellen notwendig, um möglichst definierte Zellpopulationen für verschiedene Anwendungen zu erhalten.

### **3 ZIELSETZUNG**

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass im adulten menschlichen Organismus Stammzellen vorhanden sind, die nicht, wie bisher angenommen, im Unterschied zu den embryonalen Stammzellen auf die Differenzierung in einen Gewebetyp festgelegt sind (Martin-Rendon und Watt, 2003; Prockop et al., 2003; Verfaillie et al., 2003; Weissman, 2000). Mit diesen multipotenten Stammzellen, die in vielen Geweben des Körpers nachweisbar sind, lassen sich entwicklungsbiologische Fragestellungen beantworten. Außerdem können sie für neue therapeutische Konzepte bei verschiedenen menschlichen Erkrankungen verwendet werden (Rafii und Lyden, 2003).

Die hämatopoetische Stammzelle ist die am besten charakterisierte Stammzelle, an der die meisten experimentellen Strategien und Paradigmen für adulte Stammzellen zuerst untersucht wurden (McCulloch, 2003; Metcalf, 1999; Till und Mc, 1961). Die klassische Definition der hämatopoetischen Stammzelle besteht in ihrer Fähigkeit, sich während der Lebenszeit des Organismus unbegrenzt oft zu teilen und sich in alle reifen Blutzellen zu differenzieren.

Von unserer Arbeitsgruppe und auch von anderen wurde entdeckt, dass CD133<sup>+</sup> Stammzellen aus dem peripheren Blut sich in in-vitro und in-vivo in funktionale Endothelzellen differenzieren können (Gehling et al., 2000; Kalka et al., 2000; Peichev et al., 2000). Dadurch wurde nachgewiesen, dass adulte hämatopoetische Stammzellen multipotent sind und sich in verschiedene Gewebe differenzieren können.

Aus der Differenzierungsfähigkeit der CD133<sup>+</sup> Stammzellen in die endothiale und hämatopoetische Richtung lässt sich die Hypothese ableiten, dass sie eine gemeinsame Ursprungszelle besitzen, den Hämangioblasten. Die Existenz von Hämangioblasten wurde während der Embryonalentwicklung und in adulten Mäusen nachgewiesen. Im menschlichen Organismus fehlt bis heute der Nachweis dieser Zelle (Ferrara et al., 1996; Shalaby et al., 1997; Shalaby et al., 1995). Die Forschung an multipotenten Stammzellen wird zurzeit dadurch erheblich erschwert, dass die Frequenz dieser Zellen extrem niedrig ist (Martin-Rendon und Watt, 2003).

Unter den oben dargestellten Voraussetzungen ergaben sich für die vorliegende Arbeit drei Zielsetzungen:

1. Es sollten Zellkulturbedingungen entwickelt werden, um multipotente hämatopoetische Stammzellen ex vivo zu expandieren. Als Ursprungspopulation sollten CD133<sup>+</sup> Zellen verwendet werden, die aus dem peripheren Blut mittels einer immunmagnetischen Strategie isoliert wurden.

Bei der Entwicklung der Zellkulturbedingungen sollte der Schwerpunkt auf der Expansion von Stammzellen liegen, die sowohl in die endotheliale Richtung als auch in die hämatopoetische Richtung differenzieren konnten.

Das Differenzierungspotential der expandierten Zellen in diese beiden Richtungen sollte mit Hilfe von immunphänotypischen Analysen mittels Durchflusszytometrie und durch Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt werden.

Außerdem sollte die Expression der von Hämangioblasten exprimierten Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2 mittels quantitativer PCR erfolgen.

Zusätzlich sollten Untersuchungen des koloniebildenden Potentials der expandierten Stammzellen und ihrer Fähigkeit, das Knochenmark von durch Bestrahlung myeloabladierten Mäusen zu regenerieren, durchgeführt werden.

Nach der Identifikation geeigneter Kulturbedingungen zur Expansion multipotenter Stammzellen sollte schließlich untersucht werden, ob eine Differenzierung in reife Endothelzellen möglich wäre.

2. Es sollten Endothelzellen in ausreichend großer Menge aus den ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen für eine mögliche therapeutische oder diagnostische Anwendung erzeugt werden.

3. Durch die Verfolgung des Schicksals einzelner Zellen sollte untersucht werden, ob die Stammzellpopulationen postnatale Hämangioblasten enthalten.

Dazu sollte zunächst eine retrovirale Transduktion der Stammzellen mit dem fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch nachweisbaren Marker Green Fluorescent Protein (GFP) durchgeführt werden.

Schließlich sollte mit Hilfe von Einzelzellkulturen der expandierten und markierten Stammzellen untersucht werden, ob die Nachkommen einer Ursprungsquelle sich in Endothelzellen und in hämatopoetische Zellen differenzieren könnten.

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 BEZUGSQUELLEN DER GERÄTE**

**Tabelle 4: Geräte.**

<b>Art des Gerätes</b>	<b>Bezeichnung des Gerätes</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Real-Time PCR Gerät	Light Cycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Immunmagnetisches Zellseparationsgerät	Auto-MACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Wasserbad	GFL	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Thermocycler	FTS-320	Corbett Research, Maria Worth, Österreich
Zentrifuge für Eppendorf Reaktionsgefässe	Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Varifuge 3.2 RS	Heraeus Instruments, Hanau
Spannungsgeber (Power Supply)	Model 1000/500	Bio Rad Hamburg
Pipetten	Eppendorf Reference 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Zellkultur Inkubator	Forma Scientific	Marietta, Ohio, USA
Zellkultur Sterilbank	Lamin Air	Heraeus Instruments, Hanau
Pipettierhilfe	Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Geldokumentationsgerät	Appligene Oncor	Illkirch, Frankreich
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Durchlusszytometer	FACSCalibur mit CellQuest Software	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer mit Sortiereinheit	MoFlo	Cytomation, Fort Collins USA

<b>Art des Gerätes</b>	<b>Bezeichnung des Gerätes</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Umkehrmikroskop	Wilovert	Hund, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan	Zeiss, Jena
Zytozentrifuge	Cytospin 2	Shandon, Frankfurt
CCD-Digitalkamera	SenSys	Photometrics, Livingston, England
Software für Digitalkamera	Quips Imaging Software	Applied Imaging, Newcastle upon Tyne, England
Mikroisolatoren für Mäuse	Top Flow	Techniplast
Bestrahlungskanone für Mäuse	LISA 1	Conservatome, Le valois – Perret, Frankreich
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Trio Thermo Block	Biometra, Tampa, Florida

## **4.2 BEZUGSQUELLEN DER REAGENZIEN UND ZELLEN**

**Tabelle 5: Reagenzien und Zellen.**

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>
EMRA-Med, Trittau	G-CSF $3 \times 10^7$ u/ml (Neupogen)
Blutspendedienst des Roten Kreuzes, Hamburg	HSA
Baxter, München	ACD-A
Gibco BRL, Karlsruhe	PBS Fibronectin IMDM, DMEM, Natriumpyruvat, Trypsin, 100 bp DNA-Marker, außerdem, anschließend
Sigma, Deisenhofen	DNase I FKS, Pferdeserum, Hydrocortison, Agarose
Pharmacia, Uppsala, Schweden	Ficoll-Hypaque Ready To Go You Prime cDNA Synthese Kit

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>
Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	AC/CD 133 Isolation Kit
MWG Biotech, Ebersberg	Oligonukleotide
TEBU, Offenbach	Humane Wachstumsfaktoren: VEGF, SCGF, FLT3L, IGF, HGF, SCF, LIF
Bio Whittaker, Walkersville, USA	X-Vivo 10 Medium
Boehringer Mannheim, Mannheim	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
Vector Laboratories, Burlingame, USA	VECTASHIELD Eindeckmedium
Cell Systems St. Katharinen	MethoCult GF H4434 und H4230
Qiagen, Hilden	RNeasy Mini-Kit
Qiagen, Hilden	Rnase-free DNase Kit
Invitrogen, Carlsbad, USA	Random Primer
Roche Diagnostics , Mannheim	Fast-Start DNA Master SYBR Green Kit
Cascade Biologics, Mansfield, England	HUVEC-Zellen und –Medium
Atarost, Twistringen	Ketamin
Bayer, Leverkusen	Rompunketanest

#### **4.3 BEZUGSQUELLEN DER VERBRAUCHSMATERIALIEN**

**Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.**

<b>Bezugsquelle</b>	<b>Bezeichnung</b>
BD Falcon, Heidelberg	Zellsiebe 40 µm 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen 25 cm <sup>2</sup> und 75cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen 24- und 96-Loch-Platten Plastikeinwegpipetten Plastikpetrischalen FACS Röhrchen
Nerbe, Winsen/Luhe	Sterile, RNase freie Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl und 1000 µl
Eppendorf, Hamburg	Reaktionsgefäß 1,5 und 2 ml, UVetten (UV-Küvetten)
Millipore, Schwalbach	0,45 µm Sterifiltrationseinheiten 50 ml und 100 ml
Marienfeld, Hamburg	Objekträger, Deckgläser

Bezugsquelle	Bezeichnung
Roche, Mannheim	Light Cycler Kapillaren
Schott, Mainz	Glaswaren
Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	Auto-MACS Säulen
Braun Aesculap, Tuttlingen	Sterile Einmalskalpelle
Braun, Melsungen	Sterile Spritzen und sterile Kanülen

#### 4.4 BEZUGSQUELLEN DER PRIMÄREN ANTIKÖRPER

Tabelle 7: Primäre Antikörper.

Antikörper	Spezies	Verd.	Klon-Nummer	Quelle	Analysen
CD133/2-PE	Maus anti-human monoklonal	1:10	AC141	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach	FACS
KDR/VEGFR2	Maus anti-human monoklonal	1:300	260.4	Sigma	IF
CD31	Maus anti-human monoklonal	1:50	WM59	BD/Pharmingen, Heidelberg	IF
CD31-FITC	Maus anti-human monoklonal	1:10	WM59	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
vWF	Maus anti-human monoklonal	1:60	4F9	Beckmann Immunotech, Krefeld	IF
vWF-FITC	Maus anti-human polyklonal	1:10		The Binding Site, Schwetzingen	FACS
CD144 (VE-Cadherin)-PE	Maus anti-human monoklonal	1:30	55-7H1	BD/Pharmingen, Heidelberg	IF
CD144 (VE-Cadherin)	Maus anti-human monoklonal	1:10	55-7H1	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
Ulex europaeus-Rhodamin		1:100		Vector Laboratories, Burlingame, USA	IF
Ulex europaeus		1:60		Sigma	IF

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verd.</b>	<b>Klon-Nummer</b>	<b>Quelle</b>	<b>Analysen</b>
CD13-PE	Maus anti-human monoklonal	1:10 1:30	WM15	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS, IF
CD34-FITC	Maus anti-human monoklonal	1:10	581	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD105-FITC	Maus anti-human monoklonal	1:10	418F	Cymbus Biotechnology, Hampshire England	FACS
BCRP-1-FITC	Maus anti-human monoklonal	1:10	B4155F	Chemicon, Temecula, USA	FACS
CD45-FITC	Maus anti-human monoklonal	1:10	HI30	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD45-PerCP	Maus anti-human monoklonal	1:10	HI30	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD14-PE	Maus anti-human monoklonal	1:10	M5E2	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD33-PE	Maus anti-human monoklonal	1:10	WM53	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD7-PE	Maus anti-human monoklonal	1:10	M-T701	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD90-PE	Maus anti-human monoklonal	1:10	M5E2	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD117-FITC (c-kit)	Maus anti-human monoklonal	1:10	95C3	An der Grub, Kaumberg, Österreich	FACS
CD3-PE	Maus anti-human monoklonal	1:10	HIT3A	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD19-PE	Maus anti-human monoklonal	1:10	HIB19-PE	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
CD235-PE (Glycophorin A)	Maus anti-human monoklonal	1:10	GA-R2 (HIR2)	BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS

Antikörper	Spezies	Verd.	Klon-Nummer	Quelle	Analysen
FITC Isotyp Kontrolle	Maus IgG1 Maus IgG2a	1:10		BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
PE Isotyp-Kontrolle	Maus IgG1 Maus IgG2a	1:10		BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS
PerCP Isotypkontrolle	Maus IgG1	1:10		BD/Pharmingen, Heidelberg	FACS

#### **4.5 BEZUGSQUELLEN DER SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER**

Tabelle 8: Sekundäre Antikörper.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Klon-Nummer	Quelle	Durchgeführte Analysen
Anti-Maus-FITC polyklonal	Ziege	1:40	polyklonal	DAKO, Hamburg	IF
Anti-Maus-Texas Red polyklonal	Ziege	1:40	polyklonal	DAKO, Hamburg	IF

#### **4.6 GENERIERUNG VON LEUKAPHERESEPRODUKTEN**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit Leukaphereseprodukten aus dem peripheren Blut von Patienten mit malignen Erkrankungen durchgeführt. Diese Patienten wurden mit einer Hochdosischemotherapie und autologer Stammzelltransplantation behandelt. Außerdem wurden Zellen von allogenen Stammzellspendern untersucht. Insgesamt wurden die Leukapheresate von 27 Spendern untersucht. Alle Spender und Patienten waren in die Medizinische Klinik II oder die Einrichtung für Knochenmarktransplantation des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) eingebunden und gaben ihren "Informed Consent", dass ein Teil ihrer Zellen für wissenschaftliche Zwecke benutzt werden durfte.

Stammzellen des peripheren Bluts (PBSCs) wurden durch Leukapherese nach Mobilisation aus dem Knochenmark in der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gewonnen.

Dieses Verfahren wird seit einiger Zeit erfolgreich als Alternative zur herkömmlichen Punktions des Beckenkamms zur Gewinnung von hämatopoietischen Stammzellen für autologe und allogene Stammzelltransplantationen angewandt (Verfaillie, 2002). Vorteile der Mobilisation gegenüber der Punktions bestehen in der geringeren Invasivität und schnelleren Rekonstitution der Hämatopoiese in den myeloabladierten Empfängern (Korbling und Anderlini, 2001).

Das Prinzip besteht darin, dass die Stammzellen durch das Zytokin G-CSF (Neupogen) aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden. Man kann erwarten, dass dann ca. 1,4% der mononukleären Zellen (MNC) des peripheren Blutes positiv für CD133 und ca. 1,8% dieser Zellen CD34<sup>+</sup> sind (de Wynter et al., 1998). Im normalen peripheren Blut beträgt die Frequenz dieser Zellen nur weniger als 0,5% der MNCs.

Zur Gewinnung der Stammzellen werden zunächst die weißen Blutzellen mit Pumpen und Filtersystemen aus dem peripheren Blut der Stammzellspender abgetrennt. Die enthaltenen Stammzellen werden dann mit Hilfe verschiedener Antikörper-basierter Verfahren aufgereinigt und stehen schließlich in ausreichend großer Zahl zur Verfügung (de Wynter et al., 1995).

Zur Stammzellmobilisation wurden die Patienten oder Spender für bis zu 7 Tage mit Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) in einer Dosis von 5 µg/kg/d subcutan behandelt, bis der Grenzwert von 10 CD34<sup>+</sup> Zellen pro µl Blut erreicht war und die Leukapherese durchgeführt werden konnte. Die gewonnenen Leukaphereseprodukte wurden frisch benutzt oder bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Einfrieren von Stammzellen des peripheren Blutes ist ohne Verlust ihres Stammzellpotentials möglich und wird seit längerem auch klinisch erfolgreich eingesetzt (Broxmeyer et al., 2003).

## **4.7 AUFREINIGUNG VON CD133 POSITIVEN ZELLEN AUS LEUKAPHERESEPRODUKTEN**

### **4.7.1 ISOLIERUNG DER MONONUKLEÄREN ZELLEN AUS GEFRORENEN LEUKAPHERESEPRODUKTEN**

#### **Auftaupuffer I/MACS-Puffer**

0,5% HSA; 0,6% ACD-A in PBS

#### **Auftaupuffer II**

20% HSA; 0,6% ACD-A in PBS

#### **Erythrozytenlysepuffer**

0,155 M Ammoniumchlorid; 0,01M Kaliumhydrogencarbonat; 0,001 M EDTA

Die gefrorenen Leukaphereseprodukte (ca. 70 ml) wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort im Verhältnis 1:3 in Auftaupuffer I aufgenommen. Danach wurden die Proben 15 min bei 900 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden dann in insgesamt 100 ml Auftaupuffer II mit 100 U/ml DNase I resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur sanft geschüttelt.

Danach erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation, um die mononukleären Zellen von den in den Leukapheresaten als geringe Verunreinigung enthaltenen Erythrozyten und Thrombozyten abzutrennen (Balducci et al., 2003).

Dazu wurden je 17 ml Ficoll-Hypaque mit 32 ml Zellsuspension überschichtet und 20 min bei 2000 rpm ohne Bremse bei 4°C zentrifugiert. Die sich an der Grenzschicht zwischen wässriger Lösung und der hochmolaren Polysaccharidlösung befindlichen MNCs wurden vorsichtig abgesaugt und anschließend 1x mit PBS 5 min bei 1200 rpm bei 4°C gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 10 min bei 4°C inkubiert, um nicht abgetrennte Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde 2x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen erneut in Auftaupuffer I mit 100 U/ml DNase I resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen, in Auftaupuffer I resuspendiert und mit Hilfe von Zellsieben filtriert, um Konglomerate nicht vitaler Zellen zu entfernen.

Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die mittlere Zahl der mit dieser Methode aus den eingefrorenen Leukaphereseprodukten isolierten, mononukleären Zellen betrug ca.  $7 \times 10^9$  Zellen ( $4 - 16 \times 10^9$  Zellen).

#### **4.7.2 ISOLIERUNG DER MONONUKLEÄREN ZELLEN AUS FRISCHEN LEUKAPHERESEPRODUKTEN**

##### **Auftaupuffer I/MACS-Puffer**

0,5% HSA; 0,6% ACD-A in PBS

##### **Erythrozytenlysepuffer**

0,155 M Ammoniumchlorid; 0,01M Kaliumhydrogencarbonat; 0,001 M EDTA

Zur Isolation der mononukleären Zellen aus frischen Leukaphereseprodukten wurden 2 - 4 ml des Leukapheresates im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt und auf 5 ml Ficoll-Hypaque geschichtet. Die Zellen wurden dann wie unter 4.7.1 beschrieben über einen Dichtegradienten zentrifugiert. Die gewonnenen MNCs wurden 2x mit PBS gewaschen und 10 min in Erythrozytenlysepuffer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit MACS-Puffer gewaschen, über Zellsiebe filtriert und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Die mittlere Zellzahl der mit Hilfe dieser Methode isolierten MNCs betrug  $5,4 \times 10^8$  Zellen ( $0,5 - 8,5 \times 10^8$  Zellen).

#### **4.7.3 IMMUNMAGNETISCHE SELEKTION VON CD133 POSITIVEN ZELLEN AUS DEN MONONUKLEÄREN ZELLEN VON LEUKAPHERESEPRODUKTEN**

##### **Auftaupuffer I/MACS-Puffer**

0,5% HSA; 0,6% ACD-A in PBS

Nach der Isolation der MNCs aus den Leukaphereseprodukten erfolgte die immunmagnetische Selektion der CD133<sup>+</sup> Stammzellen (de Wynter et al., 1998; Gehling et al., 2000; Matsumoto et al., 2000).

Das Prinzip dieser Methode besteht in der Kopplung von monoklonalen anti-CD133 Antikörpern an paramagnetische Partikel. Diese Partikel binden dann an das zelluläre CD133, und die positiven Zellen können anschließend mit Hilfe eines

Magneten über eine Säule abgetrennt werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurde das Auto-MACS System der Firma Miltenyi Biotech verwandt.

Zuerst erfolgte die Bindung der antikörperbeschichteten Partikel an die vorher isolierten mononukleären Zellen des mobilisierten peripheren Blutes.

Hierzu wurde die Zellzahl im Verhältnis  $1 \times 10^8$  Zellen auf 300 µl Auftaupuffer I eingestellt und mit 100 µl FCR-Blockierungsreagenz (CD133 Isolation Kit) vermischt, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper abzusättigen. Dann wurden 100 µl der antikörperkonjugierten Partikel hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 4°C inkubiert, währenddessen die Probe alle 10 min vorsichtig durchmischt wurde. Danach wurden die Zellen zweimal mit Auftaupuffer gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4°C) und die Zellzahl auf  $1 \times 10^8$  Zellen pro 500 µl Auftaupuffer eingestellt. Aus dieser Suspension wurden die CD133<sup>+</sup> Zellen mit Hilfe des Auto-MACS abgetrennt. Für die Aufreinigung wurde das Programm Possel Dx nach den Angaben des Herstellers benutzt. Es ist zu beachten, dass mit diesem Programm die größtmögliche Reinheit der isolierten Zellen erzielt werden kann. Das führt jedoch dazu, dass Zellen, die das aufzureinigende CD133 Antigen nur schwach exprimieren, nicht mit abgetrennt werden.

Die Reinheit der isolierten Stammzellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie wie unter 4.10.2 (s. S. 46 f.) beschrieben analysiert.

#### **4.8 KULTIVIERUNG VON CD133 POSITIVEN ZELLEN I: EXPANSION**

##### **Expansionsmedium**

100 ng/ml SCGF; 50 ng/ml VEGF; 50 ng/ml FLT3L; 10% FKS; 10% Pferdeserum;  $10^{-6}$  M Hydrokortison in IMDM

Zunächst wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Proliferationsbedingungen für die CD133<sup>+</sup> Stammzellen entwickelt. Eine ausreichende Proliferation der Zellen war wichtig für die Erzeugung potenzieller klinisch einsetzbarer Endothelprogenitorzellen. Außerdem sollten die Stammzellen für die geplanten Analysen ihrer Differenzierungskapazität in endothiale und hämatopoetische Zellen auf Einzelzellebene stabil mit dem Markergen enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) transduziert werden. Da zu diesem Zweck retrovirale Vektoren

benutzt werden sollten, war die Induktion der Zellproliferation eine wichtige Voraussetzung für diese Experimente.

Zur Kultivierung der isolierten Stammzellen wurden 96- oder 24-Loch-Platten 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Fibronectin in einer Konzentration von 1 mg/ml beschichtet.

Die frisch isolierten CD 133<sup>+</sup> Zellen wurden in einer Zelldichte von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in sterilfiltriertes Basis-Medium aufgenommen und in die beschichteten Vertiefungen der Zellkulturplatten ausgesät (96-Loch-Platte 300 µl Zellsuspension, 24-Loch-Platte 1 ml Zellsuspension). Das Basis-Medium mit 10% FKS, 10% Pferdeserum und 10<sup>-6</sup> M Hydrokortison wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe erfolgreich für die Kultivierung von Endothelprogenitorzellen eingesetzt (Gehling et al., 2000).

Um optimale Proliferationsbedingungen für die Zellen zu ermitteln, wurden die folgenden humanen Wachstumsfaktoren in verschiedenen Kombinationen zugesetzt: 50 ng/ml Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), 10 ng/ml Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), 10 ng/ml Hepatocyte Growth Factor (HGF), 100 ng/ml Stem Cell Growth Factor (SCGF), 100 ng/ml Stem Cell Factor (SCF), 50 ng/ml Flk-like Tyrosine Kinase 3 Ligand (FLT3L), 10 ng/ml Insuline-like Growth Factor (IGF) und 1 ng/ml Leukemia Inhibiting Factor (LIF).

Durch vergleichende Beobachtung wurde die Kombination von VEGF, SCGF und FLT3L als optimal ermittelt, um die Proliferation der Stammzellen zu induzieren und so eine Expansion der Zellen zu ermöglichen.

Unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen wurden die Zellen bis zu 70 Tage in Kultur gehalten und bezüglich ihrer Oberflächeneigenschaften, ihrer Differenzierungskapazität und ihrer Genexpression untersucht. Das Medium mit 10% FKS, 10% Pferdeserum, 10<sup>-6</sup> M Hydrocortison, 100 ng/ml SCGF, 50 ng/ml FLT3L und 50 ng/ml VEGF wird im Folgenden als Expansionsmedium bezeichnet. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 2 x 10<sup>6</sup>/ml Medium ausgesät und das Medium wurde alle 3 Tage unter Verteilung der Zellen aus einer Vertiefung auf 2 Vertiefungen gewechselt.

#### **4.9 ISOLIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN GESUNDER SPENDER**

Als Negativkontrollen für die geplanten Immunfluoreszenzanalysen der CD133<sup>+</sup> Zellen und ihrer Nachkommen sollten die mononukleären Zellen gesunder Spender (U.F., M.B. und S.L.) dienen. Hierzu wurde den gesunden Spendern durch Punktion einer Cubitalvene ca. 10 ml Blut abgenommen, das dann 1:5 mit PBS verdünnt wurde und wie unter 4.7.2 beschrieben über einen Ficoll-Hypaque Dichtegradienten zentrifugiert wurde. Nach Lyse der Erythrozyten durch Erythrozytenlysepuffer (s. 4.7.2, S. 43) und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die isolierten mononukleären Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Zytozentrifuge mit einer Dichte von 3 x 10<sup>4</sup> Zellen/300 µl PBS auf Objektträger zentrifugiert (500 rpm, 5 min, RT). Anschließend wurden die Objektträger für 5 min luftgetrocknet und bis zur weiteren Analyse bei - 20°C gelagert.

#### **4.10 IN-VITRO ANALYSEN VON PROLIFERIERENDEN UND DIFFERENZIERENDEN**

##### **STAMMZELLEN**

###### **4.10.1 MORPHOLOGIE UND PROLIFERATION**

Um die Morphologie der isolierten, proliferierenden und endothelial differenzierenden Zellen zu untersuchen, wurden diese beim Wechseln des Kulturmediums lichtmikroskopisch mit Hilfe eines Inversionsmikroskops untersucht. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Kamera fotografiert.

Die Proliferationskapazität der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer über einen Zeitraum von bis zu 63 Tagen analysiert.

###### **4.10.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE VON STAMMZELLMARKERN, ENDOTHELMARKERN UND HÄMATOPOETISCHEN MARKERN**

Frisch isolierte und unter den in der vorliegenden Arbeit entwickelten Bedingungen proliferierende CD133<sup>+</sup> Zellen wurden durchflusszytometrisch mit einem FACSCalibur untersucht.

Die Durchflusszytometrie ist ein Immunfluoreszenzverfahren zur Bestimmung der Größe, der Granularität und der Expression von Zelloberflächenmolekülen (Herzenberg und De Rosa, 2000).

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht in der hydrodynamischen Fokussierung, das heißt in der Erzeugung und Hintereinanderreihung eines Strahls von Einzelzellen und deren Erfassung durch einen fokussierten Lichtstrahl. Dadurch entsteht eine charakteristische Lichtstreuung, die mit Hilfe von Detektoren gemessen wird. Anhand der Vorwärtsstreuung des Lichtes (Forward Scatter) kann die Größe und anhand der Seitwärtsstreuung die Granularität der einzelnen Zellen ermittelt werden.

Zur Analyse von Zelloberflächenantigenen wurden in der vorliegenden Arbeit mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC, PE und PerCP konjugierte monoklonale Antikörper verwandt (Exzitationsmaximum/Emissionsmaximum FITC 494 nm/519 nm, PE 496 und 546 nm/578 nm, PerCP 482 nm/678 nm).

Das zur FACS-Analytik benutzte Gerät hat als Lichtquelle einen Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einen Rot-Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm. Die Signale bezüglich Fluoreszenz und Streulicht werden durch Filtersysteme und Photomultiplier verstärkt und mittels der Cell Quest 3.3 Software hinsichtlich der Parameter Fluoreszenzeigenschaften, Zellgröße (forward scatter) und Granularität (side scatter) analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen von verschiedenen Spendern direkt nach der Isolation der CD133<sup>+</sup> Stammzellen, über 14 Kulturtage alle drei Tage und für weitere 35 Tage alle 7 Tage auf die Zelloberflächenexpression endothelialer und hämatopoetischer Differenzierungsmarker untersucht. Ein einzelner Spender wurde bis Kulturtag 70 untersucht.

Es wurden die Zelloberflächenmoleküle CD133, CD34, CD144 (VE-Cadherin), vWF, CD31, CD45, CD14, CD105, CD90, CD117 (c-kit) und CD7 untersucht.

Als Negativkontrollen wurden PE- und FITC konjugierte Isotypkontrollen benutzt.

Für die Durchflusszytometrie wurden pro Ansatz 5 x 10<sup>5</sup> Zellen aus dem Kulturgefäß entnommen und 2x mit je 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und mit der vom Hersteller empfohlenen Antikörpermenge von in der Regel 1 µg für 5 x 10<sup>5</sup> Zellen für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut 2x mit je 500 µl PBS gewaschen und für die Messung in 300 µl PBS aufgenommen.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden jeweils 5000 Ereignisse erfasst. Die Messung der Antikörperbindung erfolgte in zwei Fluoreszenzkanälen des Zytometers.

Der im Ergebnisteil dargestellte Prozentsatz von positiven Zellen entspricht der Differenz der Prozentsätze der mit spezifischem und unspezifischem Antikörper als positiv ermittelten Zellen.

#### **4.10.3 BESTIMMUNG DES KOLONIEBILDENDEN POTENZIALS VON EX-VIVO EXPANDIERTEN STAMMZELLEN: ANALYSE VON HÄMATOPOETISCHEN UND ENDOTHELIALEN KOLONIEN**

Die Bestimmung kolonieformender Einheiten ist eine Methode zur Analyse der Proliferations- und der Differenzierungskapazität von Stammzellen. Sie wird unter 2.5.2 (s. S. 17 f.) näher beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob die frisch isolierten sowie die ex vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen in die hämatopoetische und in die endotheliale Richtung differenzieren konnten.

Zur Induktion der hämatopoetischen Differenzierung wurde Methylzellulose (MethoCult GF H4434) benutzt, welche die Wachstumsfaktoren SCF (50 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), G-CSF (20 ng/ml), GM-CSF (20 ng/ml) und Erythropoietin (3 U/ml) zur Induktion der erythroiden, monozytären, granulozytären und megakaryozytären Differenzierung enthielt.

Zur Induktion der endothelialen Differenzierung wurden der Methylzellulose die humanen Zytokine SCGF (100ng/ml) und VEGF (50 ng/ml) zugegeben. Die mit den Zytokinen versetzte Methylzellulose wurde bei - 20°C gelagert.

Für den experimentellen Ansatz wurde die Methylzellulose zunächst im Wasserbad aufgetaut. Um das koloniebildende Potenzial der ex-vivo expandierten Stammzellen zu untersuchen, wurden jeweils Doppelansätze von  $5 \times 10^3$  Zellen des jeweiligen Kulturtages gewaschen und sorgfältig in 50 µl PBS resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension mit je 1 ml der endothelkolonie-induzierenden und der hämatopoesekolonie-induzierenden Methylzellulose vermischt und in Petrischalen gegeben. Nachdem die Methylzellulose bei Raumtemperatur erstarrt war, wurden die Petrischalen für 14 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die Ansätze morphologisch auf das Vorhandensein von erythrozytären (CFU-E), granulozytären-erythrozytären-monozytären-megakaryozytären (CFU-GEMM), granulozytären-monozytären (CFU-GM), granulozytären (CFU-G) und monozytären (CFU-M) Kolonien untersucht.

Als Kolonien werden in der vorliegenden Arbeit Anhäufungen von mehr als 20 Zellen verstanden, die aus einer Ursprungszelle hervorgegangen sind. Das bedeutet, dass Ursprungszellen, die in der Lage waren, eine Kolonie zu bilden, ein großes proliferatives Potential besaßen und sich durch diese Eigenschaft von ausdifferenzierten Zellen unterschieden, die sich nicht mehr teilen. Diese Zellen werden deshalb als Progenitorzellen bezeichnet. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, den Anteil unreifer, teilungskompetenter Progenitoren an einer Gesamtpopulation von Zellen zu ermitteln.

Zusätzlich lässt sich aufgrund des aus einer Ursprungs zelle hervorgegangenen Kolonietyps auf das Differenzierungspotential der Progenitorzelle schließen. Eine CFU-GEMM Kolonie z.B. enthält Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten. Die Ursprungs zelle dieser Kolonie muss also eine unreife CMP-Zelle gewesen sein, die sich in alle myeloiden Zellen differenzieren konnte (s. Abbildung 5, S. 15). Eine CFU-G Kolonie hingegen entstand aus einer Progenitorzelle, die bereits auf die granulozytäre Linie festgelegt war.

Die phänotypische Klassifizierung hämatopoetischer Kolonien ist eine etablierte, klassische Methode in der Hämatologie und wurde bei der vorliegenden Arbeit nach den publizierten Kriterien vorgenommen (Williams, 1995).

Die endothelialen Kolonien wurden anhand ihrer typischen Morphologie, die von unserer und anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, identifiziert (Gehling et al., 2000).

Dadurch war es möglich, die endothiale und hämatopoetische Potenz der ex-vivo expandierten Zellen im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen zu bestimmen und die absolute Anzahl der Zellen mit koloniebildender Potenz durch Einberechnung des Proliferationsfaktors zu ermitteln.

#### **4.11 IN-VIVO ANALYSE VON PROLIFERIERENDEN STAMMZELLEN: REPOPULATIONSASSAY IN NOD-SCID-MÄUSEN**

Die Transplantation von nicht immunkompetenten NOD-SCID Mäusen ist eine in-vivo Methode, um zu untersuchen, ob eine Stammzellpopulation hämatopoetische Stammzellen enthält, die Blutzellen verschiedener Linien rekonstituieren können (Eaves et al., 1997; Kamel-Reid und Dick, 1988; Larochelle et al., 1996; Vormoor et al., 1994). Diese Analysen werden zurzeit als das beste Assaysystem betrachtet, um die in-vivo Funktionalität und Multipotenz hämatopoetischer Stammzellen zu beurteilen. Sie sind unter 2.5.1 (s. S. 16 f.) näher beschrieben (Dick et al., 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von NOD-SCID Mäusen untersucht, ob die ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Zellen nach einer, zwei, drei und vier Wochen Expansionskultur noch multipotente hämatopoetische Stammzellen enthielten.

##### **4.11.1 TRANSPLANTATION VON EXPANDIERTEN CD133 POSITIVEN ZELLEN IN NOD-SCID MÄUSE**

Die vier Wochen alten weiblichen NOD-SCID Mäuse wurden nach der Ankunft aus den Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) im Tierstall des Heinrich-Pette Instituts vor Transplantation der expandierten Stammzellen für zwei Wochen gehalten, um die Tiere an die neuen Bedingungen zu adaptieren. Die Tierhaltung erfolgte unter sterilen Bedingungen in Mikroisolatoren. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Bernhard Schiedelmeier durchgeführt und von der Tierschutzkommission des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf genehmigt. Zwei Stunden vor der Transplantation der Zellen wurden die Mäuse mit einer sublethalen Dosis von 3 Gray aus einer <sup>137</sup>Cs-Quelle bestrahlt, um die hämatopoetischen Stammzellen der Mäuse abzutöten.

Es wurden insgesamt 15 Mäuse mit 7 Tage expandierten Stammzellen transplantiert (5 mit  $5 \times 10^5$  Zellen, 9 mit  $5 \times 10^6$  Zellen). 4 Mäuse wurden mit  $5 \times 10^6$  Stammzellen transplantiert, die 14 Tage expandiert worden waren, und 15 Mäuse wurden mit 21 Tagen ex-vivo expandierten Zellen transplantiert (11 Mäuse mit  $5 \times 10^6$  Zellen, 4 Mäuse mit  $1 \times 10^7$  Zellen). Mit über vier Wochen expandierten

Zellen wurden insgesamt 9 Mäuse behandelt (3 Mäuse mit  $5 \times 10^6$  Zellen, 3 Mäuse mit  $1 \times 10^7$  Zellen und 3 Mäuse mit  $5 \times 10^7$  Zellen).

Die entsprechende Zahl von Stammzellen wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS in 300 µl serumfreies IMDM-Medium aufgenommen und in die Schwanzvene der Mäuse injiziert. Als Kontrollen dienten Mäuse gleichen Alters ohne Injektion humaner Zellen (n=3).

#### **4.11.2 ANALYSE DES ANWACHSENS HUMANER ZELLEN (ENGRAFTMENT)**

Die Analyse der Repopulation der transplantierten Mäuse mit humanen Zellen erfolgte ca. 3 Monate nach der Transplantation. Die Mäuse wurden zunächst mit Ketamin und Rompuketanest intraperitoneal anästhesiert und sediert. Nachdem die Wirkung der Narkose eingesetzt hatte, wurden die Tiere durch Genickbruch getötet.

Anschließend wurden die Femur- und Tibiaknochen der jeweiligen Tiere präpariert. Diese Röhrenknochen wurden dann an beiden Enden aufgeschnitten und mit Hilfe von Spritzen mit aufgesetzten Kanülen dreimal mit PBS kräftig durchgespült, um das Knochenmark zu isolieren. Das Knochenmark wurde danach in PBS aufgenommen und ca. 10x mit Spritze und Kanüle aspiriert, um eine Zellsuspension zu erzeugen. Die isolierten Knochenmarkzellen aus den einzelnen Tieren wurden dann mit PBS gewaschen, herunterzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT) und für 10 min in je 2 ml Erythrozytenlysepuffer bei RT inkubiert (s. 4.7.2, S. 43). Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Für die FACS-Analysen wurden ausschließlich humanspezifische monoklonale Antikörper verwandt. Die Knochenmarkzellen aus den transplantierten Mäusen und aus den Kontrollmäusen wurden mit den Kombinationen CD3-PE/CD45-PerCP, CD19-PE/CD45-PerCP, CD14-PE/CD45-PerCP, CD33-PE/CD45-PerCP und CD34-PE/CD45-PerCP wie unter 4.10.2 (s. S. 46 f.) beschrieben gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert.

Außerdem wurden die Knochenmarkzellen der transplantierten Mäuse sowie die der Kontrollmäuse mit den entsprechenden Isotypkontrollen gefärbt und analysiert. Es wurden jeweils 10000 Ereignisse erfasst.

Von den im Ergebnisteil dargestellten prozentualen Anteilen der verschiedenen humanen Blutzelllinien wurde jeweils die durch die Isotypkontrollen erfasste unspezifische Bindung der Antikörper an die Zellen und die geringgradige unspezifische Bindung an die murinen Blutzellen der Kontrollmäuse subtrahiert.

#### **4.12 ZELLKULTUR**

Für die Real-Time PCR-Analysen der von Hämangioblasten exprimierten Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2 wurde HUVEC cDNA als Kalibrator benutzt.

Die HUVEC-Zellen wurden vorsichtig aufgetaut und in HUVEC-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden alle drei Tage durch Ersetzen des Mediums gefüttert und unter Zuhilfenahme von Trypsin bei Erreichen der Konfluenz 1:3 gesplittet.

#### **4.13 REAL-TIME PCR-ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSFÄKTOREN SCL UND GATA-2 IN EX-VIVO EXPANDIERTEN CD133 POSITIVEN STAMMZELLEN**

##### **4.13.1 ISOLATION VON RNA UND SYNTHESE VON cDNA**

Zur Gewinnung von RNA wurden je  $5 \times 10^6$  Zellen an dem zu analysierenden Zeitpunkt der ex-vivo Expansionskulturen (d0, d14, d28 und d33) und  $5 \times 10^6$  HUVECs zweimal mit PBS gewaschen. Beim zweiten Mal wurde der Überstand vollständig abgezogen und das Zellpellet bis zur Isolierung der RNA in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei - 80°C aufbewahrt.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA der ex-vivo expandierten Stammzellen wurde das RNeasy-Kit nach den Angaben des Herstellers benutzt. Zur Entfernung möglicher Kontaminationen von genomischer DNA wurde die an die Säule gebundene RNA mit dem RNase-free DNase Kit nach Empfehlungen des Herstellers verdaut. Die Konzentration der isolierten RNA wurde spektrophotometrisch ermittelt.

Zur anschließenden cDNA-Synthese mit dem You-Prime-First-Strand cDNA Synthesis Kit wurden 3 µg RNA und 0,2 µg Random Primer nach den Angaben des Herstellers benutzt.

#### **4.13.2 REAL-TIME PCR**

Alle Primer für die Real-Time PCR wurden mit Hilfe der Primer-3 Software konstruiert (Rozen und Skaletsky, 2000). Die Primersequenzen, Primerbindungsstellen und Amplikons sind in Tabelle 9 dargestellt.

Für alle quantitativen PCRs wurde das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase als Haushaltsgen verwandt, auf das die zu analysierenden Zielgene SCL und GATA-2 normiert wurden.

**Tabelle 9: Primersequenzen, -bindungsstellen und -amplikons.**

Name	Sequenz	Amplifiziertes Fragment [bp]	Primerbindungsstelle [bp]
GAPDH Sense	TGATGACATCAAGAAGGTGG	246	840
GAPDH Antisense	TTTCTTACTCCTGGAGGCC		1085
SCL Sense	AAACCCAGTCGCCCTACTT	156	1471
SCL Antisense	CCCTTCTCTGCCTTCACAC		1626
GATA-2 Sense	GGAAGATGTCCAACAAGTCCA	268	1525
GATA-2 Antisense	CGACGTCCATCTGTTCCCTA		1792

Die quantitative Real-Time PCR wurde am Light Cycler durchgeführt. Mit Hilfe der Light-Cycler Technologie war es möglich, die Transkripte der oben genannten Zielgene auf cDNA-Ebene sensitiv zu quantifizieren.

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green. Dieser Farbstoff hat im ungebundenen Zustand nur eine geringe Eigenfluoreszenz, die durch Bindung an die kleine Furche doppelsträngiger DNA deutlich erhöht wird. Da im Verlauf einer PCR die Menge des DNA-Amplifikates zunimmt, erhöht sich auch die messbare Fluoreszenz der Proben nach Anregung des SYBR-Green Farbstoffes durch einen Laser (Exzitationsmaximum 485 nm, Emissionsmaximum 520 nm).

Während der quantitativen PCR wird die Fluoreszenz nach jedem Elongationsschritt gemessen. So kann während der linearen Phase der Zunahme der PCR-Produkte auf die Ausgangsmenge zurückgerechnet werden. Der Crossing Point (CP) ist der erste Wendepunkt der Fluoreszenzkurve und markiert den Beginn der linearen Phase der Zunahme der PCR-Produkte.

Die SCL- und GATA2-Expression der ex-vivo expandierten Stammzellen wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). Dabei wurde die Expression der Zielgene in den Stammzellen relativ zu ihrer Expression in HUVECS berechnet und auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Die Normalisierung erfolgte, um unterschiedliche cDNA-Mengen oder unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkription zu berücksichtigen. Es wurde mit den folgenden Formeln gearbeitet:

$$A = \Delta CT (\text{Stammzellen}) = CP(\text{Zielgen Stammzellen}) - CP(\text{Haushaltsgen Stammzellen})$$

$$B = \Delta CT (\text{HUVEC}) = CP(\text{Zielgen HUVEC}) - CP(\text{Haushaltsgen HUVEC})$$

$$\Delta\Delta CT = A - B$$

$$\text{Relative Menge des Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Zusätzlich zur Bestimmung des Crossing Points wurde mit jeder PCR-Reaktion eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, um unspezifische Beiprodukte der PCR zu detektieren. Hierzu wurden die Kapillaren auf 65°C heruntergekühlt und dann in kleinen Intervallen von 0,1°C/s auf 95°C unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz erhitzt. Dabei wurde der DNA-Doppelstrang der PCR-Produkte bei einer von Basenzusammensetzung und Länge abhängenden Temperatur denaturiert. Dadurch kam es zu einem messbaren Fluoreszenzabfall, da SYBR-Green nur bei Bindung an die kleine Furche fluoresziert. Da unspezifische Amplifikate eine andere Länge und Sequenz und damit eine andere Schmelztemperatur haben, wurden sie durch diese Analyse nachgewiesen. Der Schmelzpunkt des spezifischen Produktes wurde bei der Etablierung der PCRs mit Hilfe von Agarose-Gelen überprüft.

Ein Beispiel für Quantifizierung, Schmelzpunktanalyse und Agarose-Gel ist im Ergebnisteil unter 5.6 (s. S. 91 ff.) dargestellt.

Die PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des Fast Start DNA-Master SYBR-Green Kits durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl aus einer 1:50 Verdünnung der cDNA, 0,5 µM des jeweiligen Sense- und Antisense-Primers, 3 oder 4 mM MgCl<sub>2</sub> (3mM: SCL und GATA2; 4mM GAPDH) und einer 1:10-Verdünnung des im Kit vorhandenen Mastermixes hergestellt.

Es wurden Hot-Start PCRs durchgeführt. Dazu wurden die Ansätze zunächst 10 min bei 95°C unter Aktivierung der Taq-Polymerase denaturiert. Danach wurden sie 40x 15s bei 95°C, 5s bei der spezifischen Annealing-Temperatur (61°C GAPDH, 58°C SCL und 57°C GATA2) und dann 15 s bei 75°C inkubiert. Anschließend wurde die Schmelzpunktanalyse wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel. Alle im Ergebnisteil dargestellten Zahlen waren für die analysierten Stammzellen des jeweiligen Kulturtages und die als Kalibrator verwandte HUVEC cDNA Mittelwerte aus zwei Analysen des Zielgens und zwei Analysen des Haushaltsgens.

#### **4.14 KULTIVIERUNG VON CD133 POSITIVEN ZELLEN II: DIFFERENZIERUNG IN ENDOTHELIALE ZELLEN**

##### **Endotheliales Differenzierungsmedium**

50 ng/ml VEGF; 10% FKS; 10% Pferdeserum; 10<sup>-6</sup> M Hydrokortison in IMDM

Nach der erfolgreichen Etablierung von Zellkulturbedingungen zur Proliferationsinduktion der CD133<sup>+</sup> Stammzellen wurden ausreichende Ausgangszellzahlen für eine potenzielle klinische Anwendung generiert. Danach sollte untersucht werden, ob die ex-vivo expandierten Stammzellen sich noch in die endotheliale Richtung differenzieren konnten.

Zur Induktion der endothelialen Differenzierung der Stammzellen wurden diese nach 14 Tagen Expansionskultur in einer Zelldichte von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in endotheliales Differenzierungsmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in mit Fibronektin beschichtete 24- oder 96-Loch-Platten ausgesät. Das endotheliale Differenzierungsmedium enthielt im Unterschied zu dem unter 4.8 (s. S. 44 f.) beschriebenen Expansionsmedium nur das Zytokin VEGF. Das Medium

der endothelialen Differenzierungskulturen wurde alle 3 Tage durch vorsichtiges Absaugen des Überstandes gewechselt. Die endotheliale Differenzierung der Stammzellen erfolgte über 14 Tage. Die Morphologie der in-vitro generierten Endothelzellen wurde mikroskopisch mit Hilfe eines Inversionsmikroskops untersucht. Durch Immunfluoreszenzanalysen wurde außerdem die Expression endothelialer Zelloberflächenmoleküle analysiert.

#### **4.15 IMMUNFLUORESZENZANALYSE VON ENDOTHELMARKERN**

Um die Oberflächenmoleküle der in-vitro expandierten und morphologisch in endotheliale Zellen differenzierten Stammzellen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen der endothelialen Marker vWF, VE-Cadherin, Ulex-Rezeptor und CD31 durchgeführt. Diese Analysen wurden an frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen, an 14 Tage expandierten CD133<sup>+</sup> Zellen sowie an im Anschluss an die Expansion 14 Tage endothelial differenzierten Zellen durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden die mononukleären Zellen von drei verschiedenen, gesunden Spendern benutzt.

Der Oberflächenmarker KDR wurde ebenfalls an frisch isolierten sowie expandierten und danach endothelial differenzierten Stammzellen untersucht.

Zur Immunfluoreszenzanalyse wurden die proliferierenden Zellen mit Hilfe von kaltem PBS vollständig aus ihren Vertiefungen herausgelöst und einmal mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die adhärenten, endothelial differenzierten Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst, und das Trypsin wurde mit Hilfe von RPMI-Medium mit 10% FKS inaktiviert. Die Zellen wurden anschließend ebenfalls einmal mit PBS gewaschen.

Die zu analysierenden Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und in einer Dichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/300 µl PBS in einer Zytozentrifuge für 5 min bei 500 rpm auf Objektträger zentrifugiert. Die mit Zellen in Form eines Monolayers beschichteten Objektträger wurden dann 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Zur Färbung wurden die Objektträger mit den differenzierten Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und luftgetrocknet. Das Zellareal wurde mit einem Diamantstift markiert. Anschließend wurden die Objektträger mehrfach in IMDM

mit 10% FKS getaucht und dann in eine feuchte Kammer gelegt. Danach wurden die Zellen mit den entsprechend verdünnten Primärantikörpern für 30 min bei RT inkubiert (vWF 1:60, CD31 1:50, KDR 1:300, VE-Cadherin 1:30 und Ulex 1:60). Dann wurden die Objektträger mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für weitere 30 min mit dem sekundären Antikörper Ziege anti-Maus-FITC inkubiert und anschließend gewaschen.

Nach den Färbungen wurden die Zellen für 15 min in - 20°C kaltem Methanol fixiert und dann luftgetrocknet. Dann wurden die Zellen mit 29 µl einer Lösung von DAPI in VECTASHIELD Medium überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C gelagert.

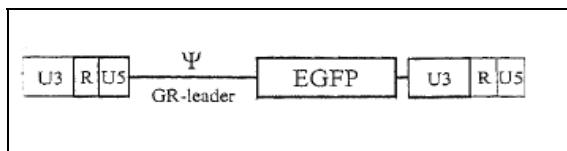
#### **4.16 RETROVIRALE TRANSDUKTION VON CD133 POSITIVEN ZELLEN**

Der in der vorliegenden Arbeit zur stabilen Transduktion der proliferierenden Stammzellen benutzte retrovirale Vektor leitet sich von den murinen Leukämieviren ab. Das SF11αEGFPrev Konstrukt basiert auf dem Friend Mink Embryonic Stem Cell Virus (FMEV) und kodiert für das Markergen enhanced Green Fluorescent Protein FP (eGFP). Das grün fluoreszierende Protein GFP wurde erstmalig in der Quallenart Aequorea victoria entdeckt (Shimomura et al., 1962). Das Exzitationsmaximum liegt bei 395 nm und das Emissionsmaximum beträgt 508 nm. Diese Eigenschaften machen es möglich, eGFP transduzierte Zellen sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. EGFP enthält Mutationen von Serin zu Threonin in Aminosäure 65 und Phenylalanin zu Leucin in Aminosäure 64, was zu einer größeren Stabilität im Vergleich zu Wildtyp-GFP führt. Die Halbwertzeit von eGFP beträgt 24 Stunden (Li et al., 1998; Wahlers et al., 2001).

In retroviralen FMEV-Vektoren wurden die langen, terminalen Wiederholungsregionen (Long Terminal Repeat, LTR) des Polycythemic Spleen Focus Forming Virus (SFFVp), der zu den Friend Mink Cell Focus Forming Viren (FMCV) gehört, und die 5` untranslatierten Regionen (Leader-Sequenz) des murinen Embryonic Stem Cell Virus (MESV) kombiniert. Die LTR-Sequenzen des SFFV führten zu einer starken Transkriptionsinitiation in multipotenten sowie linienkommitierten hämatopoetischen Progenitorzellen.

Diese Eigenschaften machten das SF11 $\alpha$ EGFPrev Konstrukt zu einem idealen Vektor zur stabilen Transduktion der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ex-vivo expandierten CD133 $^+$  Stammzellen.

Die Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung des Konstruktes.



**Abbildung 8: SF11aEGFP Vektor (Wahlers et al., 2001).** Die Long Terminal Repeat Region (LTR, lange terminale Wiederholungssequenz) besteht aus der U3- (Unique), der R- (Repeat) und der U5-Region. Die 5' untranslatierte Region vom Transkriptionsstartpunkt bis zum Translationsstartkodon wird als Leader bezeichnet. Innerhalb der Leadersequenz liegt das Verpackungssignal Ψ. Der SF11aEGFP Vektor kodiert für das Transgen Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP).

Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. B. Fehse aus der Abteilung für Knochenmarktransplantation des UKE durchgeführt. Die replikationsdefizienten Vektorpartikel wurden von der Verpackungszelllinie PG13 produziert, die das Gibbon Ape Leukemia Virus envelope (env) Protein benutzt. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit Glutamax (DMEM), 10% FKS und 1 mM Natriumpyruvat kultiviert. Die vektorhaltigen Überstände wurden mit Hilfe von X-Vivo10 Medium nach der im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die CD133 $^+$  Stammzellen entwickelten und publizierten Methode gewonnen (Ayuk et al., 1999; Kuhlcke et al., 2002). Die Virustiter wurden durch Infektionen von HT1080-Zellen mit seriellen logarithmischen Verdünnungen der Überstände und anschließender FACS-Analyse bestimmt. Die Titer in dem serumfreien X-Vivo10 Medium betrugen von  $2 \times 10^6$  IU/ml bis  $4 \times 10^6$  IU/ml.

Zur Transduktion der Stammzellen wurden wie unter 4.8 (s. S. 44 f.) mit Fibronectin beschichtete 24- oder 96-Loch-Platten mit 1000 bzw. 300  $\mu$ l virushaltigem Überstand 6x bei 800 rpm bei 4°C für 30 min zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und frische Überstände in die Löcher gegeben. Nach dieser Beschichtung der Lochplatten wurden die Stammzellen nach 3 Tagen Vorinkubation in Expansionsmedium in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$ /ml in die Lochplatten gegeben und für 24 h bei 37°C

und 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator inkubiert. Danach erfolgte der nächste Transduktionszyklus in den wie oben beschrieben vorbeschichteten Platten (Kuhlcke et al., 2002).

Für die Einzelzellanalysen wurden jeweils zwei Transduktionszyklen mit einer Ausgangszellzahl von  $3,3 \times 10^5$ /300 µl Medium in einer Vertiefung einer 96-Loch-Platte durchgeführt. Zur Untersuchung der maximalen Transduktionseffizienz erfolgten 5 Transduktionszyklen mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$ /ml Medium in einer Vertiefung einer 24-Loch-Platte.

Die Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers und der Cell Quest Software bestimmt. Hierzu wurden nichttransduzierte Zellen desselben Spenders des identischen Kulturtags als Negativkontrolle benutzt. Jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend in 300 µl PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

#### **4.17 GENERIERUNG VON EINZELZELLKULTUREN DURCH FLUORESSENZAKTIVIERTES CELL SORTING (FACS)**

Zur Erzeugung von Einzelzellkulturen stabil mit eGFP transduzierter CD133<sup>+</sup> Stammzellen wurde das Fluoreszenzaktivierte Cell Sorting (FACS) mit dem MoFlo-Gerät der Firma Cytomation benutzt. Die Arbeiten wurden am Heinrich Pette Institut in Hamburg mit Hilfe von Herrn Dipl. Biotech. A. Rimek durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode besteht in der hydrodynamischen Fokussierung, das heißt in der Hintereinanderreihung von Einzelzellen und deren Erfassung durch einen fokussierten Lichtstrahl (s. 4.10.2, S. 46 f.). Durch Kopplung einer Sortiereinheit mit dem Durchflusszytometer kann die Fluoreszenz der analysierten Zellen nicht nur gemessen werden, sondern die Zellen können auch anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften aufgetrennt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einzelne der ex-vivo expandierten und stabil retroviral mit eGFP transduzierten Stammzellen anhand ihrer Grünfluoreszenz sortiert. Die Auftrennung erfolgte aus einer Gesamtpopulation von jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen mit einem Anteil eGFP transduzierter Zellen von 4-42 % in fünf unabhängigen Experimenten. Die Einzelzellen wurden dabei in vier 96-Loch-Platten sortiert, die mit 200 µl vorgewärmtem Expansionsmedium je Vertiefung beschickt worden waren.

Nach der erfolgten Sortierung von je einer eGFP positiven Zelle pro Vertiefung wurden die Zellen zusammen mit nicht-transduzierten Fütterzellen in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert. Das Expansionsmedium wurde alle 3 Tage gewechselt. Die Proliferation der GFP-markierten Zellen wurde alle drei Tage mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops beobachtet.

#### **4.18 GENERIERUNG VON EINZELZELLKULTUREN DURCH LIMITING DILUTION**

Parallel zu der Erzeugung von Einzelzellkulturen mit Hilfe des FACS wurden Einzelzellkulturen mit der Methode der Limiting Dilution angelegt. Hierbei wurde der Anteil der eGFP positiven Zellen mit Hilfe der Durchfluszytometrie wie unter 4.16 (s. S. 57) beschrieben ermittelt.

Anschließend wurden die GFP-positiven Zellen in einer Dichte von 1 Zelle/Vertiefung in 96-Loch-Platten ausgesät. Fluoreszenz- und lichtmikroskopisch wurden die Vertiefungen ermittelt, die eine GFP-markierte Zelle enthielten. Diese wurden mit nicht transduzierten Fütterzellen in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Medium versetzt und in Expansionsmedium wie unter 4.8 (s. S. 44 f.) beschrieben kultiviert, bis die Vertiefung mindestens 30 GFP-positive Zellen enthielt. Diese Kulturperiode dauerte 18-28 Tage.

Danach wurden die aus einer einzelnen GFP-positiven Zelle gewonnenen klonalen Abkömmlinge auf zwei Vertiefungen verteilt und bezüglich ihrer Differenzierungskapazität in endotheliale und hämatopoetische Zellen, wie in den folgenden Absätzen beschrieben, untersucht.

#### **4.19 KULTIVIERUNG VON EINZELZELLKLONEN CD 133 POSITIVER ZELLEN:**

##### **DIFFERENZIERUNG IN ENDOTHELIALE ZELLEN**

###### **Endotheliales Differenzierungsmedium**

50 ng/ml VEGF; 10% FKS; 10% Pferdeserum;  $10^{-6}$  M Hydrokortison in IMDM

Um eine endotheliale Differenzierung der markierten, expandierten Stammzellen zu induzieren, wurde die Hälfte der aus einer einzelnen Zelle gewonnenen GFP-positiven Zellen für 7 Tage mit endothelialem Differenzierungsmedium inkubiert, das im Unterschied zum Expansionsmedium kein SCGF und kein FLT3 enthielt.

Das Medium wurde alle drei Tage unter vorsichtiger Aspiration des Überstandes gewechselt. Die differenzierten Zellen wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung bezüglich der Expression der endothelialen Zelloberflächenmoleküle VE-Cadherin, von Willebrand Faktor (vWF) und Ulex europaeus Rezeptor (Ulex) untersucht.

#### **4.20 KULTIVIERUNG VON EINZELZELLKLONEN CD 133 POSITIVER ZELLEN:**

##### **DIFFERENZIERUNG IN HÄMATOPOETISCHE ZELLEN**

###### **Hämatopoetisches Differenzierungsmedium**

1000 U/ml G-CSF; 10% FKS; 10% Pferdeserum;  $10^{-6}$  M Hydrokortison in IMDM

Um zu untersuchen, ob die aus einer einzelnen Stammzelle durch Expansion hervorgegangenen Zellen in die hämatopoetische Richtung differenzieren konnten, wurde die Hälfte der Nachkommen einer GFP-positiven Zelle für 7 Tage mit hämatopoetischem Differenzierungsmedium inkubiert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen und Kernfärbungen auf die granulozytentypische, segmentierte Kernform sowie auf den Oberflächenmarker CD13 untersucht.

#### **4.21 ANALYSE DER ZELLOBERFLÄCHENMARKER DER AUS EINER ZELLE**

##### **DIFFERENZIERTEN ENDOTHELZELLEN UND HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN**

Die Transduktion der proliferierenden Zellen mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff eGFP ermöglichte das Anlegen von Einzelzellkulturen. Die Nachkommen einer einzelnen Zelle konnten dann aufgeteilt werden, um die Differenzierungskapazität der einen Hälfte in die endothiale Richtung und die der anderen Hälfte in die hämatopoetische Richtung zu untersuchen.

Durch Verwendung des blauen Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol), der die DNA des Zellkerns anfärbt und durch Verwendung eines zweiten, roten Fluoreszenzfarbstoffes (Texas Red) war es möglich, eine Zelle durch die grüne Fluoreszenz als Nachkommen der einzelnen Stammzelle sowie durch typische Kernmorphologie und das rotgefärbte Oberflächenantigen CD13 als Granulozyt und damit als hämatopoetische Zelle zu identifizieren.

Analog ließ sich bei den endothelial differenzierten Zellen die grüne Fluoreszenz des GFP und die Rotfluoreszenz der endothelspezifischen Oberflächenmoleküle VE-Cadherin und Ulex europaeus Rezeptor durch den Farbstoff Texas Red nachweisen.

Zur Immunfluoreszenzanalyse wurden die endothelial und hämatopoetisch differenzierten Zellen mit Hilfe von kaltem PBS vollständig aus ihren Vertiefungen herausgelöst und einmal mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und in einer Dichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/300 µl PBS in einer Zytozentrifuge für 5 min bei 500 rpm auf Objektträger zentrifugiert. Die mit einer einzelnen Zellschicht beschichteten Objektträger wurden dann 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Zur Färbung wurden die Objektträger mit den differenzierten Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und luftgetrocknet. Das Zellareal wurde mit einem Diamantstift markiert. Anschließend wurden die Objektträger mehrfach in IMDM mit 10% FKS getaucht und dann in eine feuchte Kammer gelegt. Danach wurden die Zellen mit den entsprechend verdünnten Primärantikörpern für 30 min bei RT inkubiert (CD13 1:30, VE-Cadherin 1:30 und Ulex-Rhodamin 1:100). Dann wurden die Objektträger mit PBS gewaschen. Die mit anti-CD13 und anti-VE-Cadherin zu färbenden Zellen wurden für weitere 30 min mit dem sekundären Antikörper Ziege anti-Maus-Texas Red inkubiert und anschließend gewaschen. Ulex-Rhodamin gefärbte Zellen wurden nicht mit einem Zweitantikörper inkubiert.

Nach den Färbungen wurden die Zellen für 15 min in -20°C kaltem Methanol fixiert und dann luftgetrocknet. Dann wurden die Zellen mit 29 µl einer Lösung von DAPI in VECTASHIELD Medium überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die mit hämatopoetisch differenzierten Zellen und mit endothelial differenzierten Zellen aus einer Ursprungszelle beschichteten Objektträger, auf denen zum größten Teil nicht GFP-transduzierte Fütterzellen vorhanden waren, auf einzelne, grün fluoreszierende Zellen durchgemustert. Wenn eine grüne Zelle aufgefunden wurde, wurde sie im Blaufilter des Fluoreszenzmikroskops auf ihre

Kernmorphologie und im Rotfilter auf Zelloberflächenfluoreszenz der spezifischen Antigene CD13 (hämatopoetisch) sowie VE-Cadherin und Ulex-Rezeptor (endothelial) untersucht. Die Zellen wurden dann mit Hilfe einer Digitalkamera fotografiert.

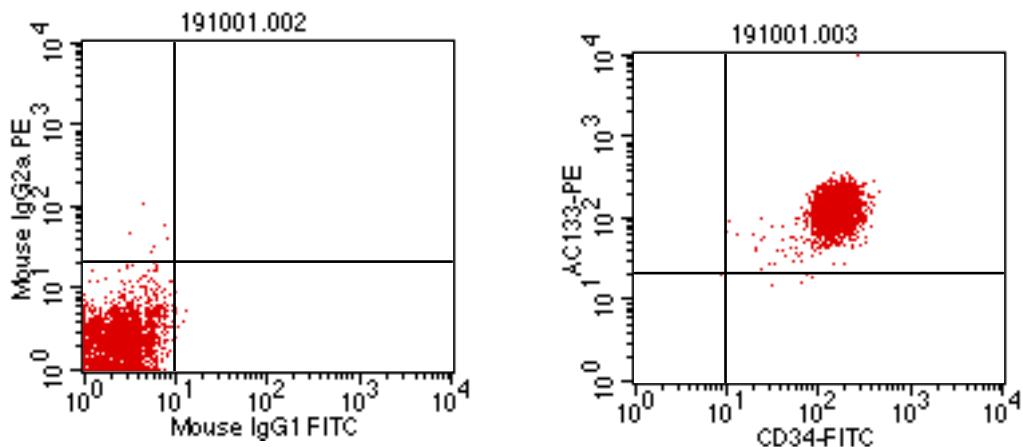
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 ISOLIERUNG VON CD133 POSITIVEN ZELLEN

Für die Analysen der vorliegenden Arbeit wurden CD133<sup>+</sup> Stammzellen aus dem peripheren Blut von 27 Spendern untersucht. Dazu wurden Aliquots (3ml) von frischen Leukapheresprodukten oder gesamte Produkte von verstorbenen Spendern (70ml) verwendet.

Der Anteil der darin enthaltenen CD133<sup>+</sup> Stammzellen betrug 0,3-0,4%. Der Mittelwert der erhaltenen Stammzellen lag bei den gefrorenen Leukapheresaten bei  $3 \times 10^7$  Zellen ( $0,6 - 3,8 \times 10^7$  Zellen; n=8) und bei den frischen Produkten bei  $1,6 \times 10^6$  Zellen ( $0,6 - 3 \times 10^6$  Zellen; n=19).

Die Reinheit der isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen wurde durchflusszytometrisch mit einem PE-konjugierten monoklonalen anti-CD133-Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde die Expression von CD34 untersucht. Dazu wurde ein FITC-konjugierter anti-CD34-Antikörper verwendet. Als Kontrollantikörper wurden PE- und FITC markierte Isotyp-Antikörper benutzt.



**Abbildung 9: FACS-Analyse von mittels immunmagnetischer Selektion aus Leukapheresprodukten isolierten CD133 (AC133) positiven Stammzellen.** Die Zellen wurden mit Isotypkontrollen (linke Abbildung) sowie mit anti-CD34-FITC und anti-CD133-PE (rechte Abbildung) gefärbt. Der größte Teil der isolierten Zellen koexprimiert die Zelloberflächenmoleküle CD133 und CD34.

Nach Abzug der unspezifischen Fluoreszenz betrug die Reinheit der CD133<sup>+</sup> Stammzellen im Mittel 97,9% (94,1-99,9%).

Die Abbildung 9 zeigt zwei repräsentative Dot Plots für die Kontrollfärbung und für die Färbung mit den Stammzellmarkern CD34 und CD133 (AC133). Es ist zu erkennen, dass der größte Teil der Zellen beide Marker koexprimierte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es mit Hilfe der immunmagnetischen Selektion möglich war, humane CD133<sup>+</sup> Stammzellen aus frischen oder gefrorenen Leukaphereseprodukten in hoher Reinheit zu isolieren. Die Ergebnisse der weiteren Immunphänotypisierung der frisch isolierten Stammzellen sind im Abschnitt 5.4 (s. S. 71 f.) gezeigt.

Anschließend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit geeignete Kulturbedingungen entwickelt, um die isolierten Stammzellen ex-vivo zu expandieren.

## **5.2 Ex-vivo EXPANSION VON HUMANEN HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN: MORPHOLOGIE**

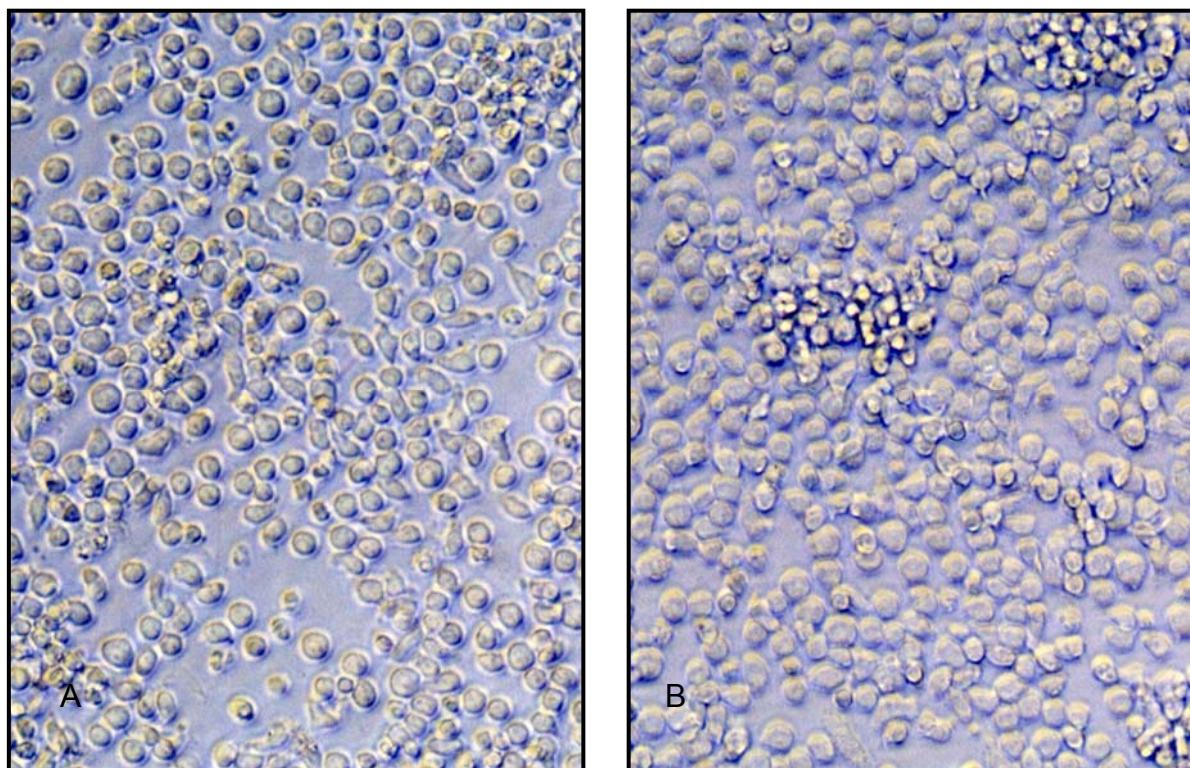
Eine möglichst starke Zellproliferation war eine Voraussetzung für die geplante retrovirale Transduktion mit dem Markergen eGFP, um die Differenzierungs-kapazität der Stammzellen in die endotheliale und hämatopoetische Richtung auf Einzelzellebene untersuchen zu können. Außerdem sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert werden, ob eine ex-vivo Expansion der CD133<sup>+</sup> Zellen ohne Verlust ihrer Stammzelleigenschaften möglich wäre und damit große Mengen an Stamm- bzw. Endothelprogenitorzellen für diagnostische oder therapeutische Zwecke gewonnen werden könnten.

Bei der Entwicklung der ex-vivo Expansionsbedingungen wurde ein bereits in der Arbeitsgruppe etabliertes Grundmedium verwandt (Gehling et al., 2000). Diesem Grundmedium wurden verschiedene humane Zytokine zugesetzt, und die Zellproliferation wurde lichtmikroskopisch untersucht.

Die Zytokinkombination SCGF (100 ng/ml), VEGF und FLT3L (beide 50 ng/ml) induzierte die stärkste lichtmikroskopisch sichtbare Proliferation der Stammzellen ab Kulturtag 3 und erwies sich so bezüglich der Zellproliferation als die effizienteste Kombination. Die anderen getesteten Zytokine induzierten keine vergleichbare Proliferation.

Die Morphologie der proliferierenden Zellen unterschied sich nicht von den frisch isolierten Zellen. Es bildete sich eine überwiegend nicht-adhärerente, homogene, relativ locker zusammenhängende Zellpopulation von überwiegend kleinen, runden Zellen. Die Abbildung 10 zeigt die Morphologie der frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen und der proliferierenden Stammzellen in den Expansionskulturen. Man sieht in der Abbildung 10B im Unterschied zu Abbildung 10A Zusammenballungen sich teilender Zellen.

Anschließend wurden die expandierten Stammzellen über einen Kulturzeitraum von bis zu neun Wochen bezüglich ihrer Proliferationskinetik, ihrer Zelloberflächeneigenschaften und ihrer Expression von Transkriptionsfaktoren untersucht.



**Abbildung 10: Morphologie der frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen (A) und der CD133<sup>+</sup> Zellen in Expansionskultur (B) (Vergrößerung 320x).** Die ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Zellen (B) unterschieden sich morphologisch nur durch Zusammenballungen sich teilender Zellen von den frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen (A).

### **5.3 Ex-vivo EXPANSION VON HUMANEN HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN: ANALYSE DER PROLIFERATIONSKINETIK**

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Expansionsmedium mit den humanen Zytokinen SCGF, VEGF und FLT3L induzierte eine starke Proliferation der isolierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen.

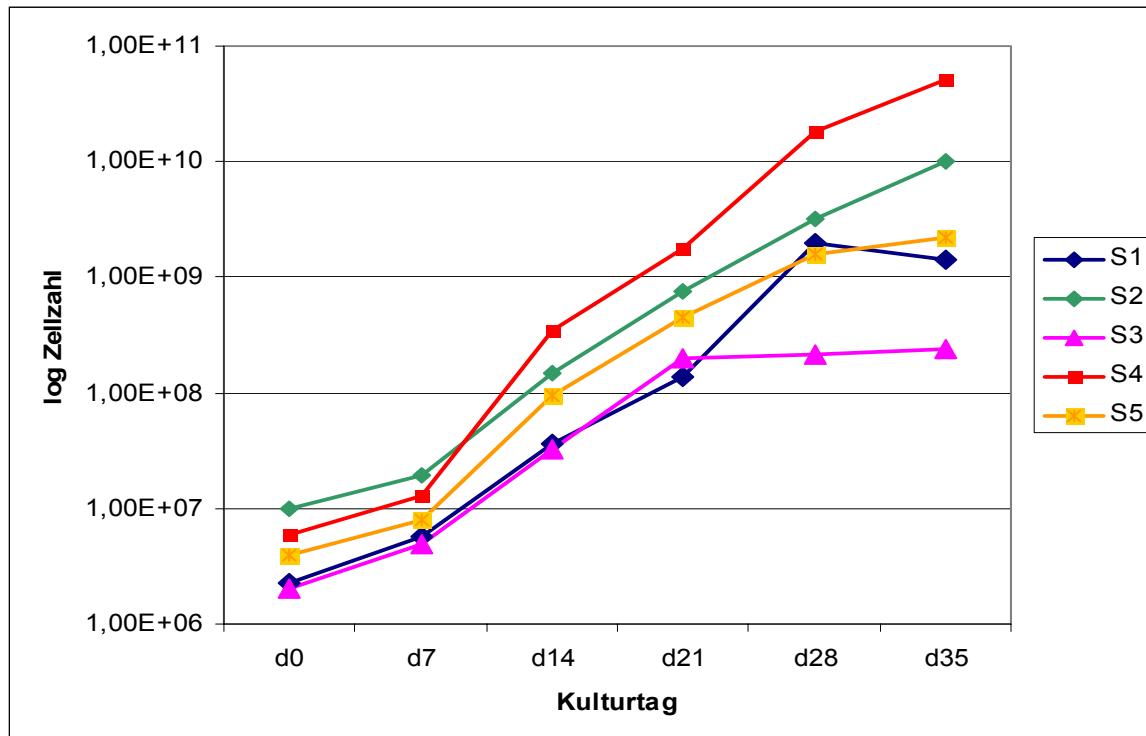
Die Abbildung 11 zeigt die absolute Zellzahlzunahme der isolierten Stammzellen von 5 verschiedenen Spendern über eine Kulturperiode von 5 Wochen.

Bis zur Kulturwoche 3 zeigte sich in allen untersuchten Expansionskulturen ein exponentieller Anstieg der Zellzahl. Danach nahm die Zellzahl von Spender 3 nur noch wenig zu. Bei den vier anderen untersuchten Spendern nahm die Zellzahl bis Kulturtag 28 weiterhin exponentiell zu. Nach Tag 28 verlangsamte sich die Zellteilung auch bei den Spendern 1 und 5 und ging bei Spender 5 in ein lineares Wachstum über. Bei Spender 1 nahm die Zellzahl sogar zwischen Woche 4 und 5 ab. Die CD133<sup>+</sup> Stammzellen der Spender 2 und 4 hingegen zeigten bis zum Kulturtag 35 eine exponentielle Zunahme der Zellzahl. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ex vivo expandierten Stammzellen bei allen untersuchten Spendern bis zum Kulturtag 28 proliferierten und bei 4 der 5 Spender sogar bis zum Kulturtag 35.

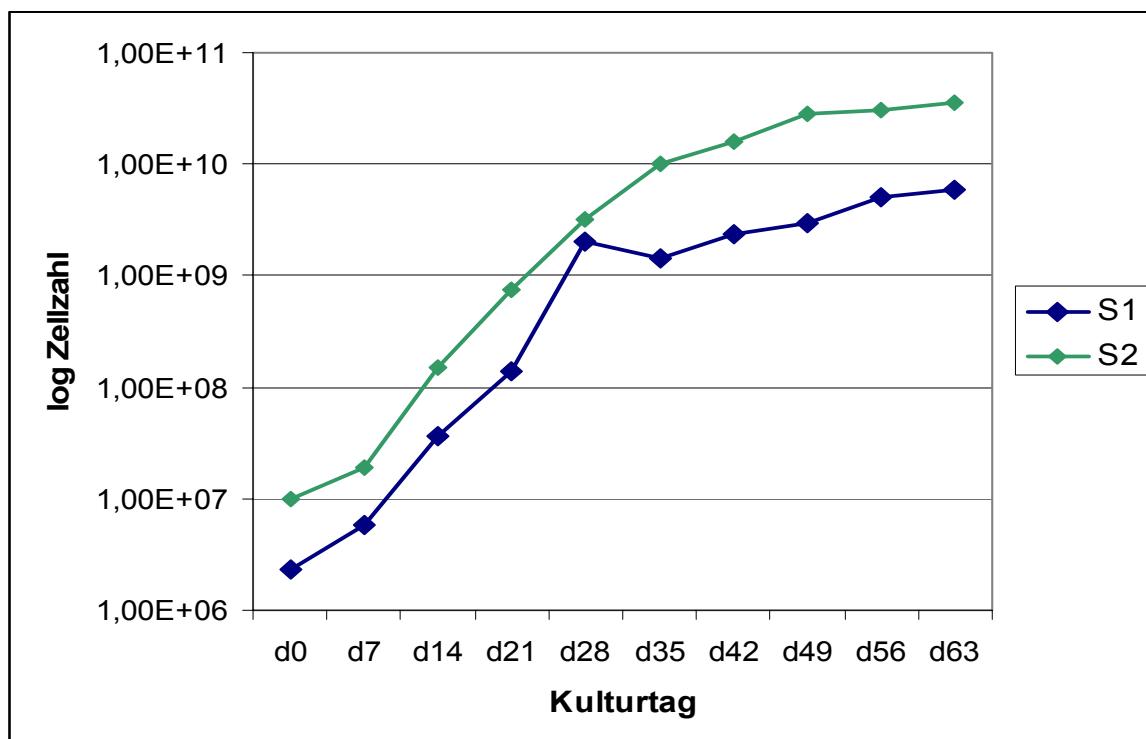
Die isolierten Stammzellen von zwei Spendern wurden über 9 Wochen bezüglich ihrer Proliferation untersucht. Es zeigte sich, dass die Stammzellen eines Spenders ab Tag 35 von einer exponentiellen Vermehrung in eine lineare Wachstumskinetik übergingen. Diese Stammzellen proliferierten, wenn auch langsamer als in den ersten fünf Wochen, kontinuierlich bis zum Kulturtag 63. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 12 gezeigt.

Berechnet man die absolute Zunahme der Gesamtzellzahl in den Expansionskulturen relativ zu der am Isolationstag der Zellen eingesetzten Zellzahl, so ergibt sich eine starke Zunahme.

In einer Kulturperiode von 14 Tagen nahm die Ausgangszellzahl im Mittel um den Faktor 25,9 zu (Faktor 15-58). Nach insgesamt fünf Wochen unter den Expansionsbedingungen mit SCGF, VEGF und FLT3L nahm die Zellzahl maximal um den Faktor 8670 und im Mittel um den Faktor 2190 zu (120-8670).



**Abbildung 11: Proliferation der CD133<sup>+</sup> Zellen in 35 Tagen (n=5; S, Spender).** Bis Tag 35 nahm bei 3 Spendern die Zellzahl exponentiell zu (S2, S4 und S5). Die Zellteilung verlangsamte sich bei einem Spender ab Tag 21 (S3) und bei einem Spender ab Tag 28 (S1).



**Abbildung 12: Proliferation der CD133<sup>+</sup> Zellen in 63 Tagen (n=2).** Die Zellzahl in den Expansionskulturen nahm über 9 Wochen zu (exponentiell bis Tag 28 (S1) bzw. Tag 35 (S2)).

Tabelle 10 und Abbildung 13 zeigen die mittlere Proliferationsrate bezogen auf die Ausgangszellzahl in insgesamt 5 Wochen Expansionskultur. In der logarithmischen Darstellung der Proliferation wird deutlich, dass die mittlere Zellzahl bis zum Kulturtag 35 exponentiell zunahm.

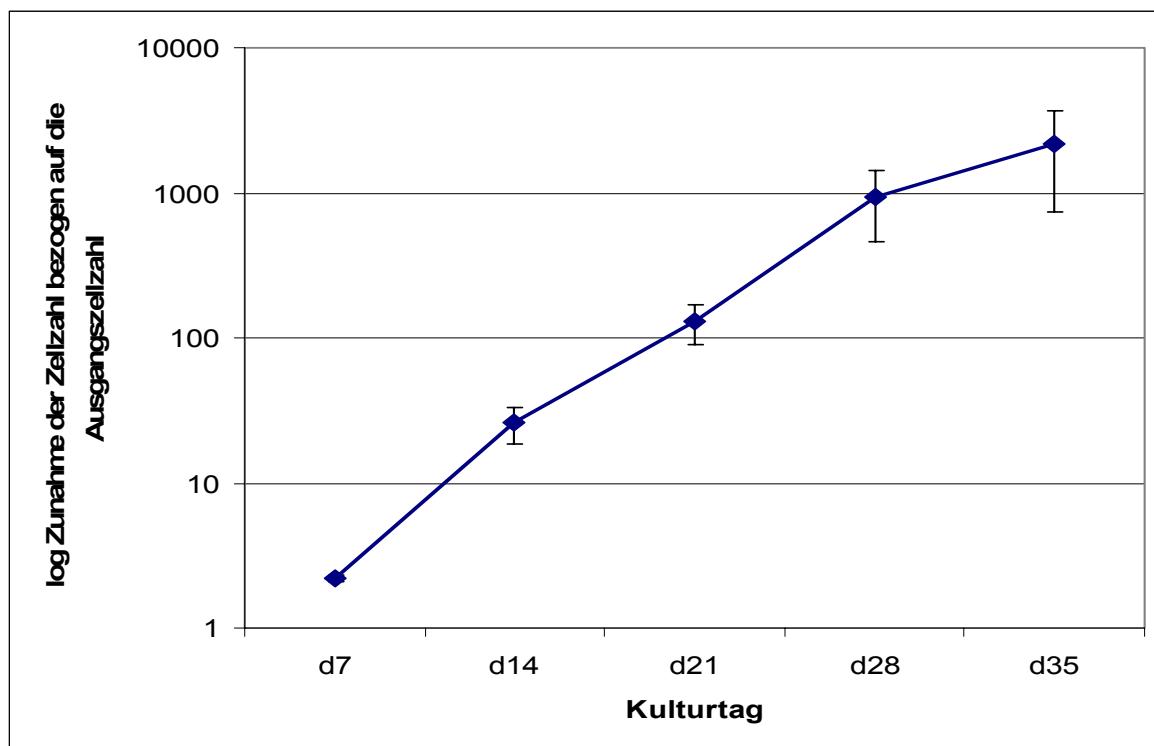
Zur Analyse der Kinetik der Zellproliferation wurde die relative Zunahme der Zellzahl der expandierten Stammzellen der fünf untersuchten Spender pro Woche über die fünfwöchige Kulturperiode berechnet. Dazu wurde die absolute Zellzahl jedes analysierten Spenders durch die absolute Zellzahl der Vorwoche dividiert. Anschließend wurde der Mittelwert dieser Zellzahlzunahme berechnet. Daraus ließ sich dann der Zeitraum ermitteln, den die Zellen benötigten, um sich im Expansionsmedium zu teilen.

Es wird deutlich, dass die durchschnittliche Proliferationsgeschwindigkeit in den Wochen 2, 3 und 4 am größten war. Benötigten die Zellen in der ersten Kulturwoche noch im Durchschnitt ca. sechs Tage, um sich zu teilen, benötigten sie in Woche zwei dafür nur 24 Stunden, in Woche 3 drei Tage und in Woche 4 zwei Tage. In der fünften Kulturwoche teilten sich die Zellen nur noch alle 8 Tage. Dieses Ergebnis ist in Tabelle 10 gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Expansionsmedium eine starke Proliferation der isolierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen induzierte. Nach einer fünfwöchigen Kulturperiode hatte sich die Zellzahl im Durchschnitt um den Faktor 2200 erhöht und die exponentielle Zunahme der Zellzahl ging in eine lineare Kinetik über. Die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen war in den Wochen 2, 3 und 4 am höchsten und nahm danach kontinuierlich ab.

**Tabelle 10: Zunahme der Zellzahl bezogen auf die am Isolationstag (d0) eingesetzte Zellzahl und Zeit für die Verdopplung der Zellzahl (n=5).** Nach 35 Tagen ex-vivo Expansion nahm die absolute Zellzahl bezogen auf die Ausgangszellzahl im Mittel 2190-fach zu. Die Zellen teilten sich in der Kulturwoche 2 mit einer Verdopplung pro Tag am schnellsten (S, Spender; ZZ, Zellzahl; KT, Kulturtag; SF, Standardfehler).

KT	KT/d0	KT/d0	KT/d0	KT/d0	KT/d0	Mittelwert KT/d0	SF	Verdopplung der ZZ [Tage]
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>			
<b>d7</b>	2,51	1,9	2,5	2,2	2	2,2	0,1	6
<b>d14</b>	16	15	16,3	58,3	24	25,9	7,4	1
<b>d21</b>	60,9	76	100	300	113	130	38,9	3
<b>d28</b>	870	320	106	3000	400	939	474	2
<b>d35</b>	617	1000	120	8670	550	2190	1453	8



**Abbildung 13: Logarithmische Darstellung der Zunahme der Zellzahl pro Woche bezogen auf die Ausgangszellzahl (+/- Standardfehler; n=5).** Die mittlere Zellzahlzunahme verlief in 5 Wochen Expansionskultur exponentiell.

#### **5.4 PHÄNOTYPISCHE ANALYSE VON EX-VIVO EXPANDIERTEN STAMMZELLEN: DURCHFLUSSZYTOMETRIE**

Die ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen wurden über einen Kulturzeitraum von insgesamt 7 Wochen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Es wurde die Zelloberflächenexpression der Stammzellmarker CD133, CD34, CD90, CD117 und CD7, der Endothelmarker vWF, VE-Cadherin (CD144), CD105 und CD31, der Endothel- und Monozytenmarker CD14 sowie des Panleukozytenmarkers CD45 wurde gemessen. Die Zellen wurden in den ersten 2 Wochen alle 3 Tage untersucht, um den Anfang der Proliferationsphase genauer zu analysieren. Anschließend wurden die proliferierenden Stammzellen über weitere 5 Wochen wöchentlich auf die Expression der oben genannten Zelloberflächenmarker geprüft.

So sollte festgestellt werden, ob die proliferierenden Zellen während der ex-vivo Expansion Stammzell- und Endothelantigene exprimierten.

Außerdem wurde unter Einbeziehung des Proliferationsfaktors festgestellt, ob die den jeweiligen Marker exprimierenden Zellen unter den entwickelten Kulturbedingungen proliferierten.

Die Tabelle 11 zeigt das zusammenfassende Ergebnis der FACS-Analysen in den Expansionskulturen während der ersten 14 Tage und die Tabelle 12 während weiterer 35 Tage.

Fast alle proliferierenden Zellen exprimierten am Isolationstag der CD133<sup>+</sup> Stammzellen und während der ex-vivo Expansion den gemeinsamen hämatopoetischen Marker CD31 und den Panleukozytenmarker CD45.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der FACS-Analysen von proliferierenden CD133<sup>+</sup> Stammzellen in den ersten 2 Wochen Expansionskultur (+/- Standardfehler; d0, n=9; d3-12, n=3; d14, n=8).**

	d0 [%]	d3 [%]	d6 [%]	d9 [%]	d12 [%]	d14 [%]
<b>CD133</b>	98,3 $\pm$ 0,5	81,1 $\pm$ 4,1	58,6 $\pm$ 20,9	37,6 $\pm$ 26,9	8,1 $\pm$ 1,5	13,5 $\pm$ 3,8
<b>CD34</b>	97,8 $\pm$ 0,6	91,1 $\pm$ 2,5	37,2 $\pm$ 5,2	11,5 $\pm$ 5,2	4,4 $\pm$ 1,9	4,8 $\pm$ 0,7
<b>CD90</b>	15,8 $\pm$ 3,8	25,3 $\pm$ 24,4	2,3 $\pm$ 1,0	32,7 $\pm$ 22,2	24,4 $\pm$ 16,1	18,8 $\pm$ 5,8
<b>CD117</b>	8,2 $\pm$ 3,0	24,8 $\pm$ 8,1	43,5 $\pm$ 13,9	15,0 $\pm$ 7,7	2,2 $\pm$ 0,7	10,5 $\pm$ 2,7
<b>CD7</b>	5,8 $\pm$ 1,6	3,9 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 1,3	5,2 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,9
<b>CD105</b>	4,2 $\pm$ 1,8	8,7 $\pm$ 6,9	39,9 $\pm$ 22,5	21,5 $\pm$ 15,9	36,2 $\pm$ 31,1	53,1 $\pm$ 10,7
<b>CD31</b>	99,4 $\pm$ 0,2	99,1 $\pm$ 0,8	99,1 $\pm$ 0,7	98,0 $\pm$ 0,7	97,1 $\pm$ 1,9	96,1 $\pm$ 1,3
<b>CD144</b>	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,6	3,2 $\pm$ 1,6	1,6 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,8
<b>vWF</b>	1,2 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 1,0	3,6 $\pm$ 2,4	3,8 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 0,7	4,5 $\pm$ 1,5
<b>CD14</b>	1,5 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 1,2	31,6 $\pm$ 9,9	48,9 $\pm$ 4,6	40,2 $\pm$ 4,4	45,9 $\pm$ 3,6
<b>CD45</b>	99,7 $\pm$ 0,1	98,4 $\pm$ 1,2	99,5 $\pm$ 0,2	98,0 $\pm$ 0,7	97,6 $\pm$ 0,5	96,4 $\pm$ 1,0

**Tabelle 12: Zusammenfassung der FACS-Analysen von proliferierenden CD133<sup>+</sup> Stammzellen von Woche 3 bis Woche 5 der Expansionskultur (+/- Standardfehler; d21, n=8; d28, n=11; d35, n=10; d42, n=11; d49, n=5).**

	d21 [%]	d28 [%]	d35 [%]	d42 [%]	d49 [%]
<b>CD133</b>	14,8 $\pm$ 4,9	5,6 $\pm$ 1,9	11,7 $\pm$ 4,1	8,1 $\pm$ 2,8	5,5 $\pm$ 2,5
<b>CD34</b>	1,3 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,2
<b>CD90</b>	17,1 $\pm$ 3,3	26,5 $\pm$ 4,2	16,9 $\pm$ 2,4	14,9 $\pm$ 2,8	8,1 $\pm$ 2,3
<b>CD117</b>	7,2 $\pm$ 2,0	1,9 $\pm$ 0,4	8,4 $\pm$ 2,8	2,1 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,5
<b>CD7</b>	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,4	0,2 $\pm$ 0,1
<b>CD105</b>	44,5 $\pm$ 5,2	53,8 $\pm$ 6,3	46,2 $\pm$ 5,0	42,7 $\pm$ 5,7	35,1 $\pm$ 6,1
<b>CD31</b>	92,8 $\pm$ 2,1	96,2 $\pm$ 0,9	95,4 $\pm$ 1,2	92,4 $\pm$ 2,2	89,1 $\pm$ 3,3
<b>CD144</b>	2,9 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 1,2	3,4 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,6
<b>vWF</b>	3,7 $\pm$ 0,9	5,5 $\pm$ 1,8	6,2 $\pm$ 1,5	5,8 $\pm$ 2,2	5,3 $\pm$ 2,5
<b>CD14</b>	50,6 $\pm$ 3,4	36,1 $\pm$ 3,5	35,2 $\pm$ 3,5	36,5 $\pm$ 5,6	43,5 $\pm$ 5,3
<b>CD45</b>	95,8 $\pm$ 1,2	97,6 $\pm$ 0,5	96,9 $\pm$ 0,8	94,8 $\pm$ 2,3	93,1 $\pm$ 1,1

#### **5.4.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE VON EX-VIVO EXPANDIERTEN STAMMZELLEN: ANALYSE DER STAMMZELLMARKER CD133, CD34, CD90, CD117 UND CD7**

Betrachtet man zunächst die Expression von CD133 während des Kulturzeitraumes von 7 Wochen in der Gesamtpopulation der expandierten Zellen, so erkennt man, dass der Prozentsatz der positiven Zellen von Tag 0 (98,3%) bis Tag 12 (8,1%) deutlich abnahm. Da in der Population der CD133<sup>+</sup> Zellen viele linienkommtierte Progenitoren enthalten waren, differenzierten diese Zellen z.B. in Monozyten aus. Im weiteren Verlauf der ex-vivo Expansion blieben jedoch im Mittel 5,5-14,8% CD133<sup>+</sup> Zellen erhalten.

Während der gesamten Kulturperiode waren also proliferierende Zellen vorhanden, die das CD133 Antigen exprimierten.

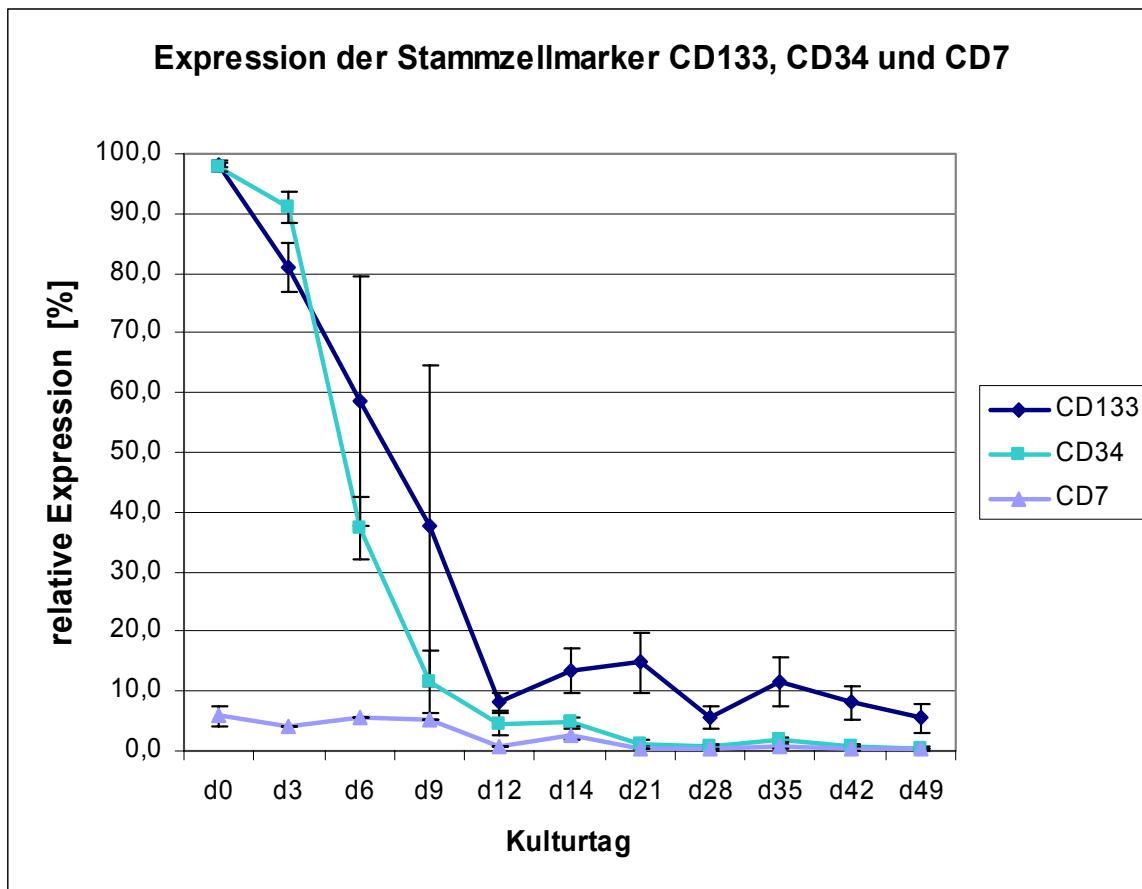
Bei der Betrachtung des Stammzellmarkers CD34 während der analysierten Kulturperiode zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Population der CD34<sup>+</sup> Zellen in den Expansionskulturen von im Mittel 97,8% am Tag 0 auf 0,5% am Tag 49.

Der Prozentsatz der CD7 exprimierenden Zellen betrug am Isolationstag der CD133<sup>+</sup> Zellen 5,8%. Auch diese Zellpopulation nahm rasch innerhalb von 14 Kulturtagen auf Werte von unter 1% ab.

Abbildung 14 zeigt die grafische Darstellung der CD133, CD34 und CD7 Expression in den Expansionskulturen.

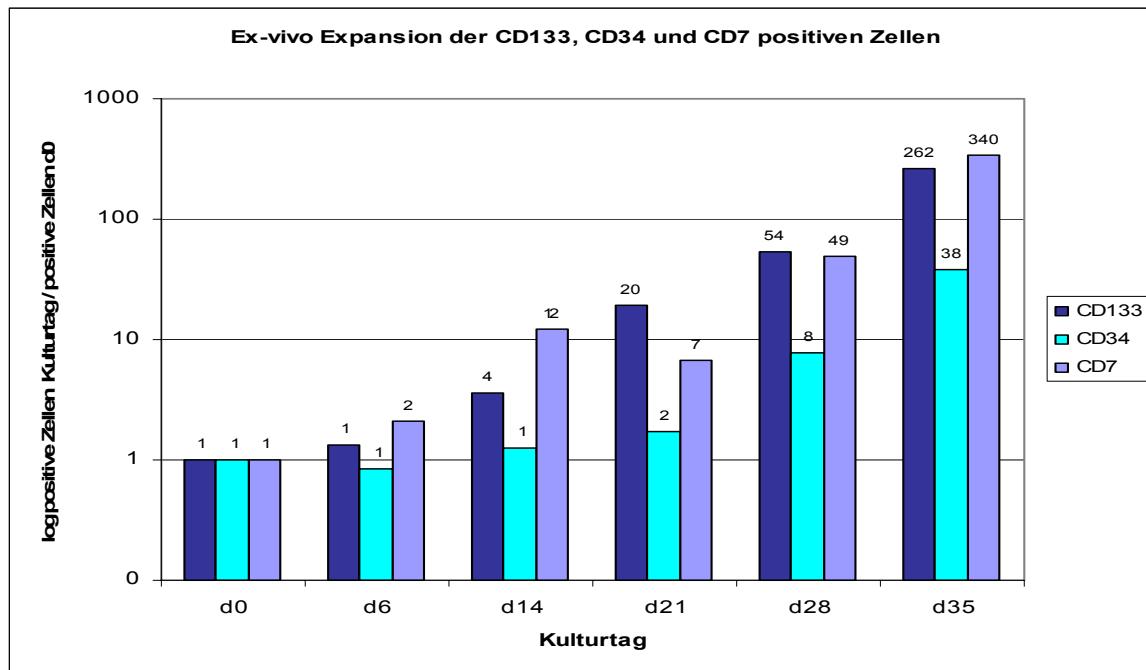
Betrachtet man nun das Verhältnis der die Stammzellmarker CD133, CD34 und CD7 exprimierenden Zellen bezogen auf die am Tag 0 eingesetzte Ausgangszellzahl und multipliziert diesen Wert mit dem Proliferationsfaktor der Zellen (s. Tabelle 10), so ergibt sich die absolute Zahl der den entsprechenden Marker am jeweiligen Kulturtag exprimierenden Zellen. Wegen der starken Proliferation der Stammzellen in den ex-vivo Kulturen zeigten alle betrachteten Populationen eine exponentielle Zunahme.

Dieses Ergebnis für den Kulturzeitraum von 5 Wochen ist in Abbildung 15 (s. S. 75) gezeigt. Die CD133<sup>+</sup> Stammzellen wurden um den Faktor 262 und die CD7<sup>+</sup> Zellen um den Faktor 340 expandiert. Die schwächste Proliferation (38-fach) zeigten die CD34<sup>+</sup> Zellen.

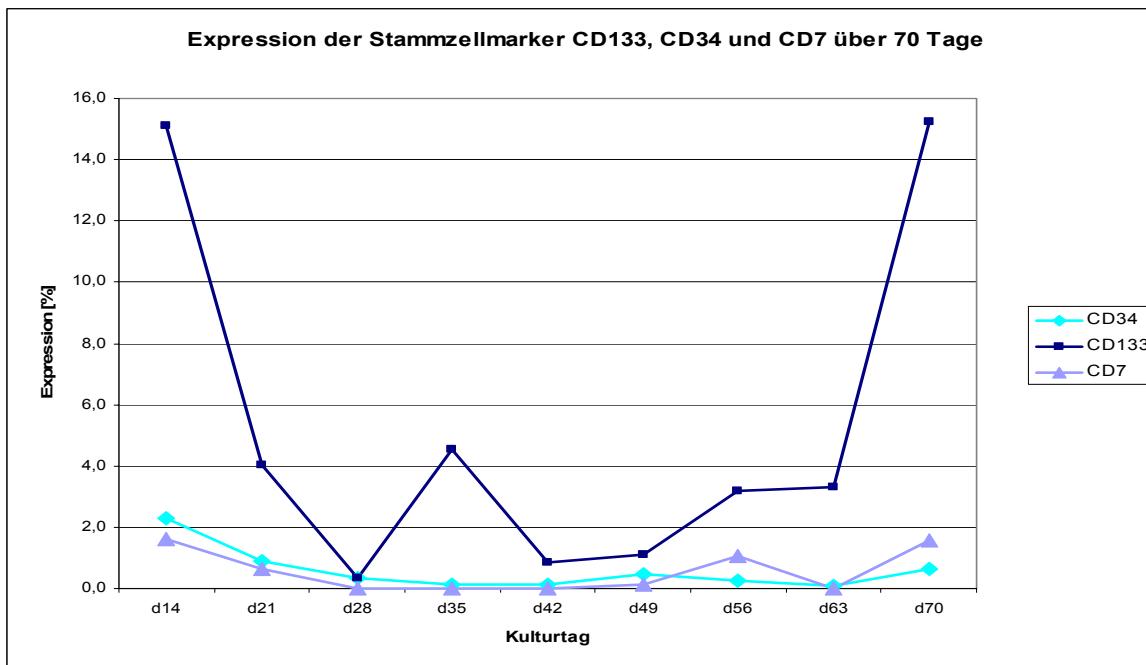


**Abbildung 14: Relative Expression von CD133, CD34 und CD7 in der Gesamtpopulation der expandierten Stammzellen über einen Kulturzeitraum von 7 Wochen.** Die Population der CD133<sup>+</sup> Zellen zeigte bis Tag 12 eine rasche Abnahme. Im weiteren Verlauf der ex-vivo Expansion blieben jedoch im Mittel 5,5-14,8% CD133<sup>+</sup> Zellen erhalten. Die CD7<sup>+</sup> Zellen nahmen schnell auf Werte von unter 1% ab. Die relative CD34 Expression nahm ebenfalls schnell auf ca. 1% ab. (+/- Standardfehler; n s. Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 72)

Die CD133<sup>+</sup> Stammzellen eines Spenders wurden über 70 Tage ex-vivo expandiert und ab Tag 14 jede Woche auf die Expression der Stammzellmarker CD133, CD34 und CD7 analysiert. Dabei zeigte sich, dass ein Teil der Zellen auch nach über 7 Wochen in den Expansionskulturen noch CD133 exprimierte. Daraus kann man schließen, dass in den Expansionskulturen auch nach einer Kulturdauer von 10 Wochen unreife Stammzellen vorhanden waren. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 16 gezeigt.



**Abbildung 15: Ex-vivo Expansion von CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> und CD7<sup>+</sup> Zellen relativ zur am Tag 0 eingesetzten Zellzahl.** Die Population der CD133<sup>+</sup> Zellen nahm in 5 Kulturwochen ca. um den Faktor 260 zu, die CD7<sup>+</sup> Zellen nahmen um den Faktor 340 und die CD34<sup>+</sup> Zellen um den Faktor 38 zu (n s.Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 72).



**Abbildung 16: Expression der Stammzellmarker CD133, CD34 und CD7 in den Expansionskulturen eines Spenders von Tag 14 bis Tag 70.** Nach 10 Wochen ex-vivo Expansion blieben in den Kulturen ca. 14% unreife CD133<sup>+</sup> Stammzellen erhalten. Der Anteil der CD34<sup>+</sup> und der CD7<sup>+</sup> Zellen betrug dagegen nur weniger als 2%.

Bei der Betrachtung des Zelloberflächenmarkers CD90 ergab sich im Verlauf der ex-vivo Expansion eine relativ starke Zunahme der Expression von initial 15,8% auf 2,3-32,7% (s. Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 72). Die Population der CD90<sup>+</sup> Zellen wurde nach insgesamt 5 Kulturwochen um den Faktor 2435 expandiert. Der relative Anteil der CD117 exprimierenden Zellen betrug am Isolationstag der Stammzellen 8,2% und während der ex-vivo Kulturen 1,1-43,5%. Die absolute Zahl der CD117 positiven Zellen nahm in 35 Kulturtagen um den Faktor 2244 zu. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Kulturbedingungen mit den Zytokinen VEGF, SCGF und FLT3L eine erfolgreiche Expansion von unreifen humanen Stammzellen möglich war.

#### **5.4.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE VON EX-VIVO EXPANDIERTEN STAMMZELLEN: ANALYSE DER ENDOTHELMARKER CD144 (VE-CADHERIN) UND VON WILLEBRAND FAKTOR**

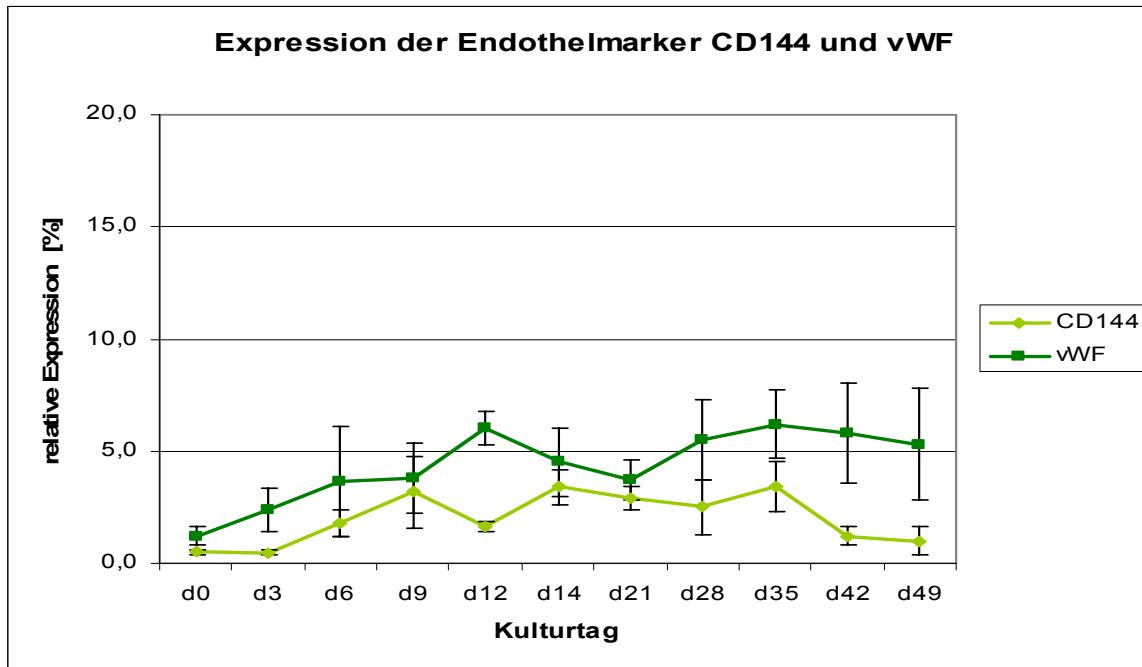
Das endothelspezifische Zelloberflächenmolekül VE-Cadherin (CD144) zeigte während der ex-vivo Expansion der Stammzellen ein ähnliches Verhalten wie der Marker vWF. CD144 und vWF werden sowohl von Endothelvorläuferzellen als auch von reifen Endothelzellen exprimiert.

Der Anteil der VE-Cadherin positiven Zellen betrug am Isolationstag der Stammzellen 0,5%. Er erreichte während der Kulturperiode maximal 3,4% (d14 und d35) und zeigte damit einen leichten Anstieg. Die grafische Darstellung der VE-Cadherin Expression ist in Abbildung 17 gezeigt.

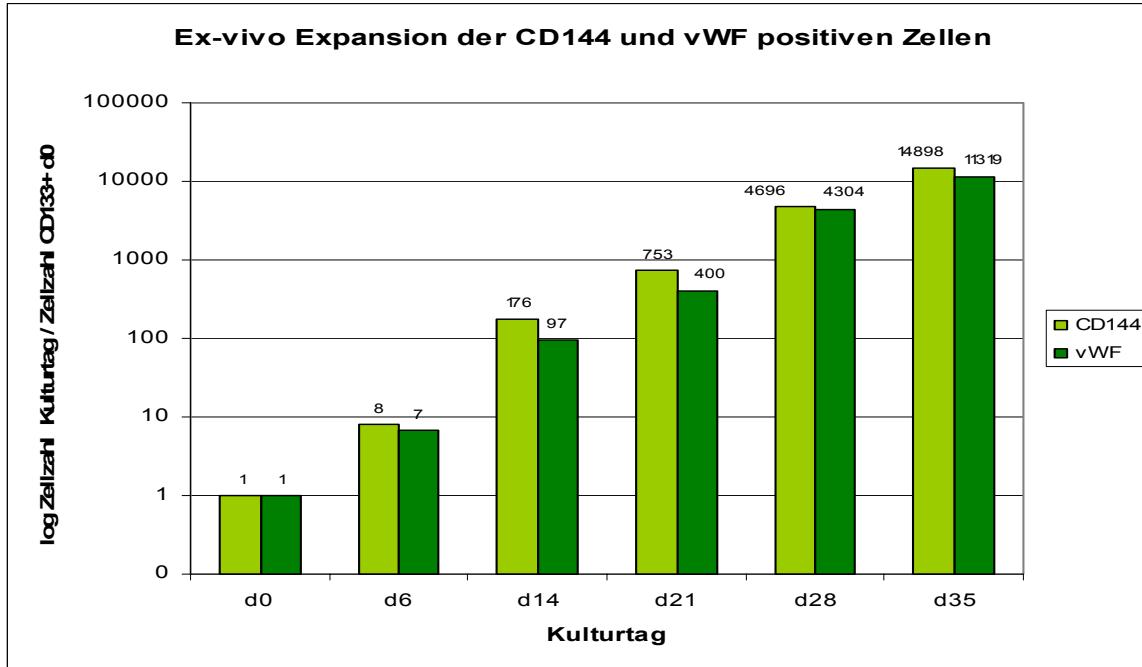
Die Expression des Endothelmarkers von Willebrand Faktor stieg unter den Expansionsbedingungen von 1,2% am Tag 0 auf maximal 6,2% am Tag 35 an. Der prozentuale Anteil der von Willebrand Faktor positiven Zellen blieb damit während des betrachteten Kulturzeitraumes auf niedrigem Niveau. Abbildung 17 veranschaulicht dieses Ergebnis.

Betrachtet man die absoluten Zahlen der endothelmarkerexprimierenden Zellen, so zeigte sich eine Zunahme der CD144 positiven Zellen um den Faktor 14898 und der vWF positiven Zellen um den Faktor 11319 nach 5 Wochen Expansionskultur.

Die grafische Darstellung der ex-vivo Expansion der CD144 und vWF positiven Zellen ist in Abbildung 18 gezeigt.



**Abbildung 17: Relative CD144 und vWF Expression in der Gesamtpopulation der expandierten Stammzellen über einen Kulturzeitraum von 7 Wochen.** Die CD144<sup>+</sup> und vWF<sup>+</sup> Zellen zeigten einen leichten Anstieg. (+/- Standardfehler; n s. Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 72)



**Abbildung 18: Ex-vivo Expansion von CD144<sup>+</sup> und vWF<sup>+</sup> Zellen relativ zur am Tag 0 eingesetzten Zellzahl.** Nach 5 Wochen Expansionskultur nahmen die CD144<sup>+</sup> Zellen ca. um den Faktor 15000 und die vWF<sup>+</sup> Zellen ca. um den Faktor 11000 zu. Dieses Ergebnis zeigt eine Proliferation von endothelialen Zellen in den Kulturen (n s. Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 72).

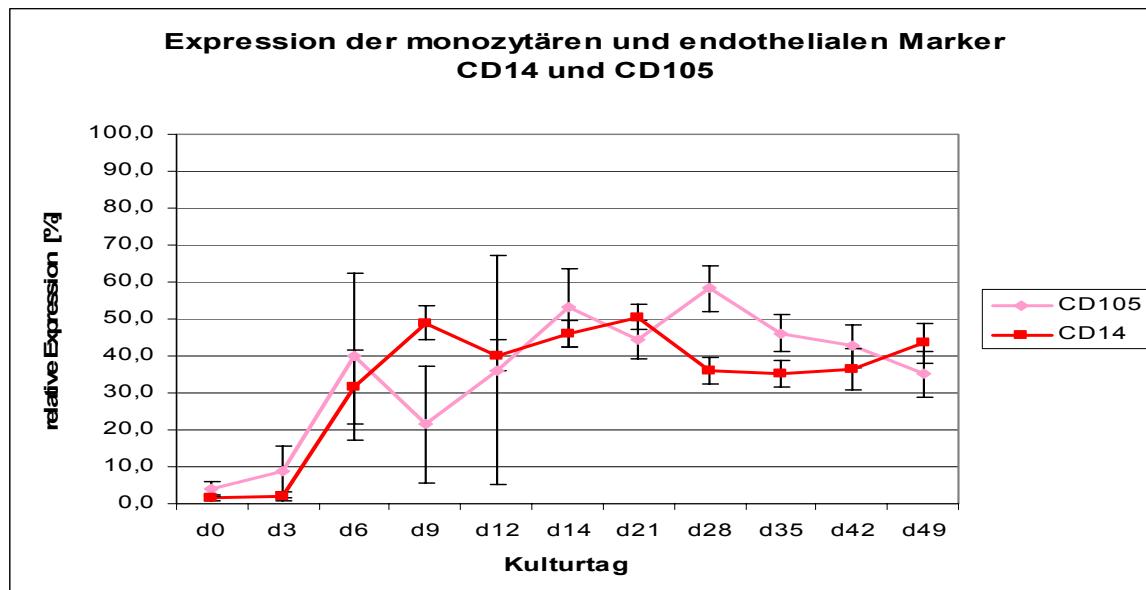
Die durchflusszytometrische Analyse von CD144 und vWF ergab, dass Endothel- und/oder Endothelprogenitorzellen unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Kulturbedingungen stark proliferieren konnten.

#### **5.4.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE VON EX-VIVO EXPANDIERTEN STAMMZELLEN: ANALYSE DER ENDOTHEL- UND MONOZYTENMARKER CD14 UND CD105**

Der Prozentsatz der Zellen, die am Isolationstag CD14 exprimierten, betrug 1,5%. Dieser Anteil stieg während der Expansionskultur auf den relativ hohen Wert von 31,6-50,6% an.

Die Expression von CD105 verhielt sich ähnlich. Am Tag 0 waren nur 4,2% der Zellen CD105 positiv, im weiteren Kulturverlauf erreichte der relative Anteil der CD105<sup>+</sup> Zellen ein Plateau von 21,5-53,8%. Der Verlauf der CD14 und CD105 Expression ist in Abbildung 19 gezeigt.

Die absoluten Zahlen der CD14 und CD 105 positiven Zellen nahmen während 5 Wochen Expansionskultur um den Faktor 51411 bzw. 24099 zu.

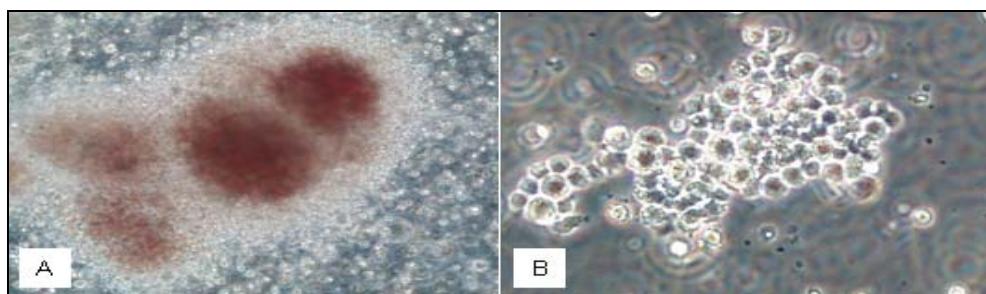


**Abbildung 19: Relative CD14 und CD105 Expression in der Gesamtpopulation der expandierten Stammzellen während eines Kulturzeitraums von 7 Wochen.** Die Expression der Endothel- und Monozytenmarker CD14 und CD105 nahm in den Expansionskulturen von Werten um 1% am Isolationstag der Zellen auf Werte um 40% nach Tag 12 zu. Das zeigt eine starke Proliferation von endothelialen und/oder monozytären Zellen in den Expansionskulturen (+/- Standardfehler; n s. Tabelle 11 und Tabelle 12, S. 72).

Insgesamt zeigte sich ein relativ hoher Anteil von CD14 und CD105 positiven Zellen in den Expansionskulturen. Bei einem Teil dieser Zellen könnte es sich aber auch um Endothelzellen handeln, da CD14 und CD105 auch von endothelialen Zellen exprimiert werden.

#### **5.4.4 BESTIMMUNG DES KOLONIEBILDENDEN POTENZIALS DER EX-VIVO EXPANDIERTEN STAMMZELLEN: ANALYSE VON HÄMATOPOETISCHEN UND ENDOTHELIALEN KOLONIEN (COLONY ASSAYS)**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, das koloniebildende Potenzial der ex-vivo expandierten Stammzellen zu untersuchen. Dabei sollte sowohl der Anteil der hämatopoetischen als auch der endothelialen Progenitoren ermittelt werden. Zwei hämatopoetische Kolonietypen sind exemplarisch in Abbildung 20 gezeigt.



**Abbildung 20: CFU-GEMM Kolonie (A, Vergrößerung 100x) und CFU-M Kolonie (B, Vergrößerung 200x)** (CFU-GEMM, Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte; CFU-M, Colony Forming Unit Monocyte).

Die relativen Anteile der Progenitorzellen an der Gesamtpopulation der proliferierenden Zellen, welche die verschiedenen untersuchten Kolonietypen bildeten, sind in Tabelle 13 gezeigt.

Analysiert man die Anteile der verschiedenen unreifen Progenitorzellen an der Gesamtzellpopulation, so war der Anteil der erythrozytären Progenitoren am Isolationstag der CD133<sup>+</sup> Zellen mit 1,1% am größten. Der Anteil der erythrozytären Progenitoren halbierte sich innerhalb der ersten beiden ex-vivo Kulturwochen. Im weiteren Verlauf der ex-vivo Kultur reduzierte sich der Anteil dieser unreifen Progenitoren auf Werte zwischen 0,01% und 0,07%.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der relativen Anteile der Progenitoren mit koloniebildendem Potenzial bezogen auf die Gesamtpopulation der CD133<sup>+</sup> Zellen am Isolationstag sowie nach bis zu 7 Wochen ex-vivo Expansion (CFU-E, Colony Forming Unit-Erythrocyte; CFU-GEMM, Colony Forming Unit-Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte; CFU-GM, Colony Forming Unit-Granulocyte Monocyte; CFU-G, Colony Forming Unit-Granulocyte; CFU-M, Colony Forming Unit Monocyte; CFU-EC, Colony Forming Unit Endothelial Cell).**

Kulturtag	CFU-E [%]	CFU-GEMM [%]	CFU-GM [%]	CFU-G [%]	CFU-M [%]	CFU-EC [%]
d0 (n=6)	1,1 ± 0,3	0,5 ± 0,4	3,7 ± 0,8	1,3 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1
d14 (n=5)	0,6 ± 0,5	0,02 ± 0,01	1,0 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1
d21 (n=2)	0,01 ± 0,01	0	0,2 ± 0,1	0,25 ± 0,01	0,4 ± 0,02	1,3 ± 0,3
d28 (n=3)	0,07 ± 0,04	0,02 ± 0,02	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,4
d35 (n=2)	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,3 ± 0	0,2 ± 0,1
d42 (n=3)	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,08 ± 0,06	0,1 ± 0,06	0,3 ± 0,2	1 ± 0,3
d49 (n=2)	0,01 ± 0,01	0	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,3 ± 0,1	1 ± 0,4

Der Anteil der CFU-GEMM bildenden Progenitoren betrug am Isolationstag 0,5% der eingesetzten Zellen. Nach 14 Tagen in Expansionskultur lag der Anteil dieser Progenitorzellen nur noch bei 0,02%. Abgesehen von den Kulturtagen 21 und 49, an denen diese sehr unreifen Progenitorzellen gar nicht nachweisbar waren, blieb ihr Anteil in diesem niedrigen Bereich.

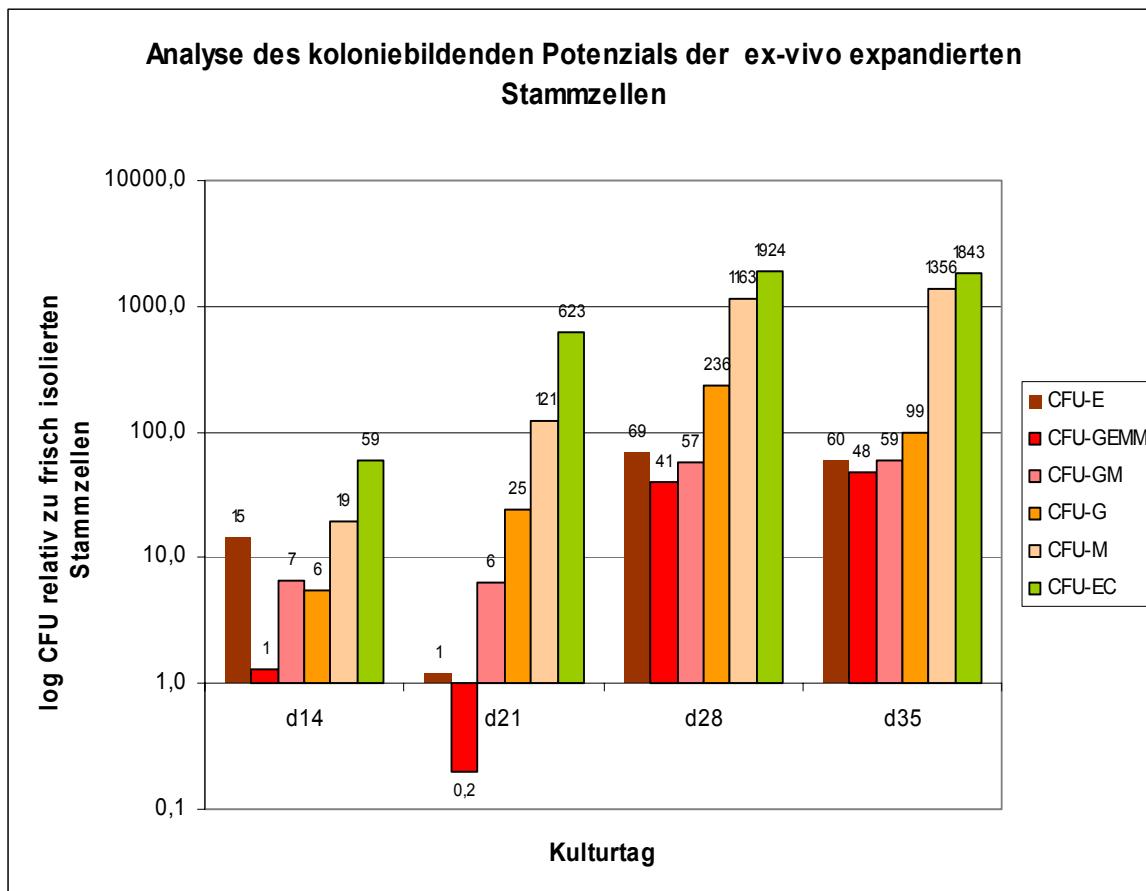
Die CFU-GM Progenitorzellen machten am Isolationstag 3,7% der eingesetzten Zellen aus. Im Verlauf der Kultur nahm ihr Anteil kontinuierlich ab und betrug am Tag 14 noch 0,5% und am Tag 49 nur noch 0,02%.

Der Anteil der CFU-G Progenitoren nahm von 1,3% am Tag 0 auf 0,02% am Tag 49 ab. Betrachtet man den Anteil der CFU-M Progenitorzellen, stellt man fest, dass ihr Anteil relativ konstant blieb und zwischen Werten von 0,3% und 0,5% schwankte.

Die endothelialen Progenitorzellen zeigten in den Expansionskulturen ein anderes Verhalten als die hämatopoetischen Zellen. Ihr prozentualer Anteil war nur an Tag 35 etwas geringer als an Tag 0 (0,3% bzw. 0,2%), an den anderen Kulturtagen hatte sich ihr Anteil mindestens verdoppelt und maximal verdreifacht.

Bezieht man nun die Zellproliferation in den Expansionskulturen mit in die Analyse des koloniebildenden Potenzials der Stammzellen ein, so zeigt sich eine starke Zunahme der absoluten Koloniezahlen. Abbildung 21 zeigt die absolute Zunahme

der verschiedenen hämatopoetischen und endothelialen Progenitorzellen mit koloniebildendem Potenzial.



**Abbildung 21: Zunahme von koloniebildenden Progenitoren in den Expansionskulturen.** Logarithmische Darstellung der absoluten Zunahme von Progenitoren mit erytrozytärer (CFU-E), granulozytärer-erythrozytärer-megakaryozytärer-monozytärer (CFU-GEMM), granulozytärer-monozytärer (CFU-GM), granulozytärer (CFU-G), monozytärer (CFU-M) und endothelialer (CFU-EC) koloniebildender Potenz in der Population der ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen, verglichen mit frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten ex-vivo Expansionsbedingungen eine Proliferation unreifer hämatopoetischer und endothelialer Progenitorzellen induzierten.

In den ex-vivo Kulturen expandierten die erythroiden Progenitoren um einen Faktor von maximal 68,9 am Kulturtag 28. Die Vorläuferzellen mit granulozytärer, erythrozytärer, monozytärer und megakaryozytärer Potenz nahmen um einen Faktor von maximal 47,7 am Tag 35 zu. Bei den granulozytär-monozytären

Progenitorzellen betrug der Zunahmefaktor maximal 58,6, jeweils verglichen mit ihrer Zahl in der Population der frisch isolierten Stammzellen. Die granulozytären Vorläuferzellen nahmen um einen Faktor von maximal 235,9 (d28) und die monozytären Vorläuferzellen von maximal 1355,7 (d35) zu.

Die Anzahl der Vorläuferzellen mit der Potenz, endotheliale Kolonien zu bilden, nahm unter den etablierten Kulturbedingungen am stärksten zu, nämlich um den Faktor 1923,8 am Tag 28.

Die Analyse des koloniebildenden Potenzials der ex-vivo expandierten Stammzellen bestätigte, dass die ex-vivo Expansionsbedingungen die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen und endothelialer Progenitorzellen induzieren konnten. Die Proliferation der endothelialen und monozytären Vorläuferzellen war in diesem funktionellen Assaysystem am stärksten, was die durchfluszytometrischen Daten bestätigt.

## **5.5 ANALYSE DES ENGRAFTMENTS TRANSPLANTIERTER EXPANDIERTER CD133<sup>+</sup> POSITIVER STAMMZELLEN IN NOD-SCID MÄUSEN**

Zur in-vivo Analyse der Multipotenz der ex-vivo expandierten Stammzellen wurden Repopulierungsanalysen in NOD-SCID Mäusen durchgeführt. Da das Knochenmark der Mäuse erst nach 3 Monaten auf humane Zellen untersucht wurde, konnten die langzeitrepopulierenden Eigenschaften der kultivierten Zellen analysiert werden.

Dazu wurden die Mäuse mit Zellen transplantiert, die 7 Tage, 14 Tage, 21 Tage und 32 Tage in den Expansionskulturen proliferiert hatten. In Tabelle 14 und Tabelle 15 wird ein Überblick über die Anzahl der transplantierten Tiere und die Anzahl der Stammzellen, die zu den verschiedenen Zeitpunkten transplantiert wurden, gezeigt. Außerdem ist der prozentuale Anteil der Tiere dargestellt, die überlebten und bei denen nach der Transplantation humane Zellen nachweisbar waren, was als Engraftment bezeichnet wird.

Betrachtet man das Überleben der Mäuse und das Anwachsen humaner Zellen, so fällt auf, dass bei allen überlebenden Mäusen humanes Engraftment nachweisbar war.

**Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung von Überleben und Engraftment der mit 7 und 14 Tage expandierten Stammzellen transplantierten Mäuse.**

Kulturtag	d7		d14
Transplantierte Zellzahl [ $\times 10^6$ ]	0,5	5	5
Transplantierte Mäuse	6	9	4
Überlebende Mäuse	0	5	4
Überlebende Mäuse mit Engraftment humaner Zellen	0	5	4
Überleben und Engraftment [%]	0	55,6	100

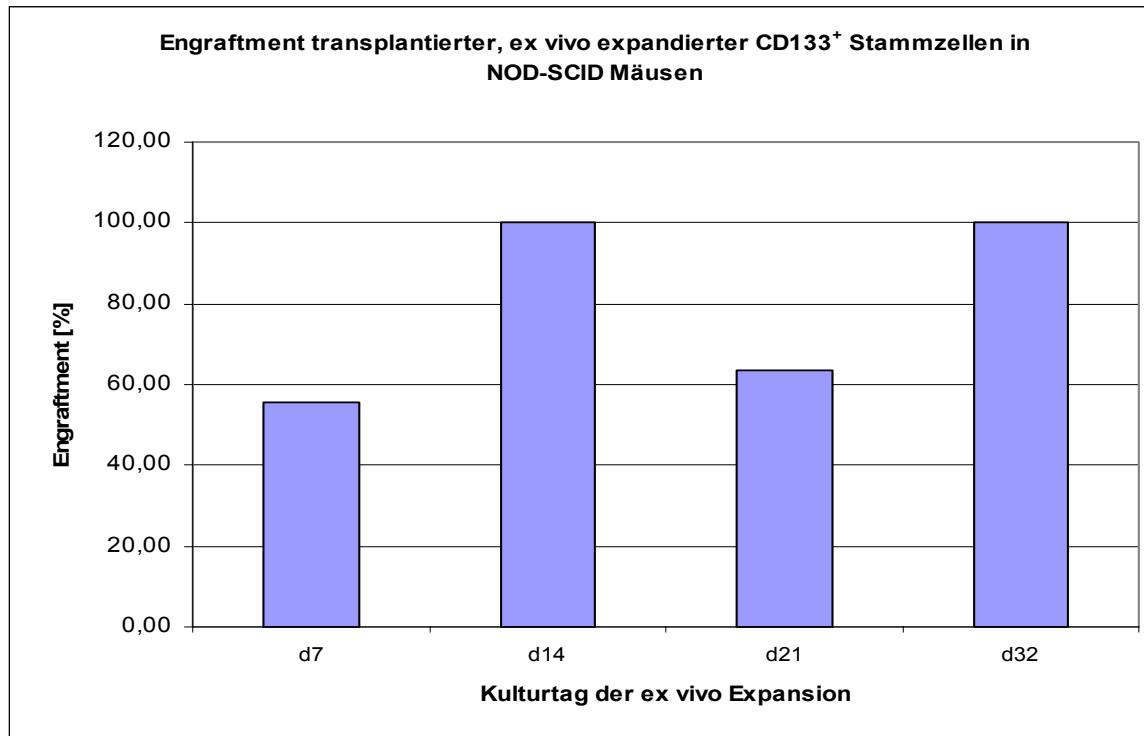
**Tabelle 15: Zusammenfassende Darstellung von Überleben und Engraftment der mit 21 und 32 Tage expandierten Stammzellen transplantierten Mäuse.**

Kulturtag	d21		d32		
	5	10	5	10	50
Transplantierte Zellzahl [ $\times 10^6$ ]	5	10	5	10	50
Transplantierte Mäuse	11	4	3	3	3
Überlebende Mäuse	7	0	3	1	2
Überlebende Mäuse mit Engraftment humaner Zellen	7	0	3	1	2
Überleben und Engraftment [%]	63,6	0	100	33,3	75

Bezüglich der transplantierten Zellzahlen lässt sich feststellen, dass bei den am kürzesten ex-vivo expandierten Stammzellen von den mit  $5 \times 10^6$  Zellen transplantierten Tieren ca. 60% überlebten, während alle mit einer Zehnerpotenz weniger Zellen behandelten Tiere starben.

Von den mit  $5 \times 10^6$  14 Tage expandierten Stammzellen transplantierten Tieren überlebten alle.

Am Kulturtag 21 wurden Mäuse mit  $5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zellen transplantiert. Von den mit der niedrigeren Zellzahl transplantierten Tieren überlebten ca. 64%, und von denen mit der höheren Zellzahl transplantierten überlebte kein Tier. Von den Mäusen, die mit  $5 \times 10^6$  vier Wochen ex-vivo expandierten Zellen transplantiert wurden, überlebten alle, von den mit  $1 \times 10^7$  Zellen transplantierten Tieren nur 33%. Von den mit  $5 \times 10^7$  Zellen transplantierten Tieren überlebten 75%. Abbildung 22 veranschaulicht den Prozentsatz von zu den verschiedenen Zeitpunkten mit  $5 \times 10^6$  Zellen transplantierten Mäusen, die überlebten und humanes Engraftment zeigten.



**Abbildung 22: Analyse des Engraftments von je  $5 \times 10^6$  ex-vivo expandierten Stammzellen in myeloablatierten NOD-SCID Mäusen.** Darstellung des Prozentsatzes der mit ex-vivo expandierten Stammzellen transplantierten Mäuse, die überlebten und in deren Knochenmark humane Zellen nachweisbar waren (d7, n=9; d14, n=4; d21, n=11; d32, n=3).

Bei den oben beschriebenen Effekten der transplantierten Zellzahl auf das Überleben der Mäuse handelte es sich wahrscheinlich um zufallsbedingte Schwankungen. Für eine statistisch signifikante Aussage war die Anzahl der mit der jeweiligen Zellzahl transplantierten Mäuse zu gering.

Das entscheidende Ergebnis aber ist, dass Mäuse, die mit über 4 Wochen expandierten Stammzellen transplantiert wurden, überlebten und ein Angehen von humanen Zellen zeigten.

In die weiteren Analysen wurden nur die Mäuse mit einbezogen, die mit  $5 \times 10^6$  Zellen transplantiert wurden, um die Daten vergleichen zu können.

Bei den mit je  $5 \times 10^6$  ex-vivo expandierten Stammzellen transplantierten Mäusen wurde die Expression der folgenden Linienmarker im Knochenmark durchflusszytometrisch bestimmt: CD45 (Panleukozytenmarker), CD3 (T-Zellen), CD19 (B-Zellen), CD14 (Monozyten), CD33 (Granulozyten) und CD34 (Stammzellen). Bei einigen Tieren wurde außerdem der erythrozytäre Marker CD235 (Glycophorin A) bestimmt.

Das Ergebnis nach Abzug der unspezifischen Fluoreszenz (Isotypkontrollen) und der geringgradigen unspezifischen Bindung der humanspezifischen monoklonalen Antikörper an murine Blutzellen aus nicht-transplantierten Kontrollmäusen ist in Tabelle 16 gezeigt.

Der Prozentsatz der humanen Zellen im Knochenmark der Mäuse zeigte eine große Varianz und betrug von 0,2% bis 31,8%. Der höchste Wert wurde mit humanen Stammzellen erreicht, die 7 Tage expandiert worden waren. Der mittlere Anteil humaner Zellen am Knochenmark der Mäuse betrug mit 7 Tage ex-vivo expandierten Zellen 11,1% (0,7-31,8%), mit 14 Tage expandierten Stammzellen 3,3% (1,9-6,5%), mit 21 Tage kultivierten Zellen 3,5% (0,2-5,1%) und mit 32 Tage expandierten Zellen 1,9% (0,2-2,7%).

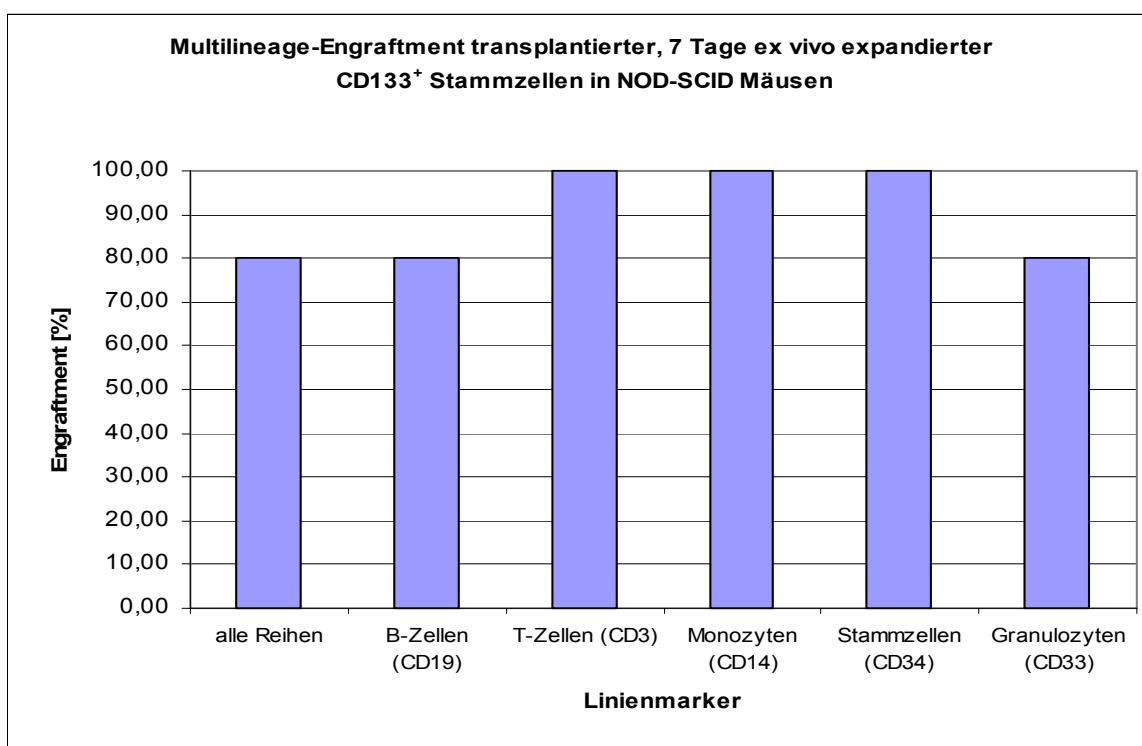
Damit zeigte sich die Tendenz eines höheren Anteils humaner Zellen am Knochenmark der Mäuse, die mit den am kürzesten ex-vivo expandierten Stammzellen transplantiert worden waren.

**Tabelle 16: Humanes Multilineage Engraftment (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Stammzellen, Granulozyten und Erythrozyten) nach Transplantation von expandierten Stammzellen als Prozentsatz der anti-human CD45 positiven Zellen in NOD-SCID Mäusen.** Es wurden je  $5 \times 10^6$  für 7, 14, 21 und 32 Tage expandierte Stammzellen transplantiert (n.b., nicht bestimmt).

Kulturtag und Mäuse	CD45 <sup>+</sup> [%]	CD3 <sup>+</sup> [% von CD45]	CD19 <sup>+</sup> [% von CD45]	CD14 <sup>+</sup> [% von CD45]	CD34 <sup>+</sup> [% von CD45]	CD33 <sup>+</sup> [% von CD45]	GlyA <sup>+</sup> [% von CD45]
d7							
<b>M1</b>	0,7	25,9	0	55,4	18,7	0	n.b.
<b>M2</b>	9	8,6	20,2	11,1	20,4	39,7	n.b.
<b>M3</b>	31,8	4	9,1	6,2	7,9	59,5	13,3
<b>M4</b>	7,5	14,8	8,3	22,7	17,8	6	30,4
<b>M5</b>	6,4	19,8	5,1	22,2	27,8	0,9	24,1
<b>Mittelwert</b>	<b>11,1</b>	<b>14,6</b>	<b>8,5</b>	<b>23,5</b>	<b>18,5</b>	<b>21,2</b>	<b>22,1</b>
d14							
<b>M1</b>	1,9	42,22	0	0	0	0	57,8
<b>M2</b>	2,7	0	0	0	100	0	0
<b>M3</b>	6,5	29,2	0	6,3	49,4	12,5	2,6
<b>M4</b>	2,2	31,5	0	0	0	0	68,5
<b>Mittelwert</b>	<b>3,3</b>	<b>25,7</b>	<b>0</b>	<b>1,6</b>	<b>37,4</b>	<b>3,1</b>	<b>32,2</b>
d21							
<b>M1</b>	1,5	0	0	0	100	0	n.b.
<b>M2</b>	1,24	19,4	7,9	8,9	57	6,8	n.b.
<b>M3</b>	4,2	13,9	3,9	0	36,2	0	46
<b>M4</b>	5,1	20,8	31,8	1,8	11,6	0	34,1
<b>M5</b>	4	0	1,9	0	28,8	3,1	66,1
<b>M6</b>	0,2	0	0	0	0	0	100
<b>M7</b>	4,1	0	0	0	75,4	0	24,6
<b>Mittelwert</b>	<b>2,9</b>	<b>7,7</b>	<b>6,5</b>	<b>1,5</b>	<b>44,1</b>	<b>1,4</b>	<b>54,2</b>
d32							
<b>M1</b>	0,2	22,4	19,9	23,5	22,1	12,2	n.b.
<b>M2</b>	2,71	36,2	18,2	18	23,4	3,7	n.b.
<b>M3</b>	1,2	70,4	24,6	0	5	0	n.b.
<b>Mittelwert</b>	<b>1,4</b>	<b>43</b>	<b>21</b>	<b>13,8</b>	<b>16,8</b>	<b>5,3</b>	<b>n.b.</b>

Bei der qualitativen Betrachtung des Engraftments zeigte sich, dass alle betrachteten leukozytären Linienmarker bei 80% der mit 7 Tage ex-vivo expandierten Stammzellen transplantierten Tiere nachgewiesen wurden. Lediglich eins von fünf Tieren hatte keine humanen B-Zellen und Granulozyten in seinem Knochenmark.

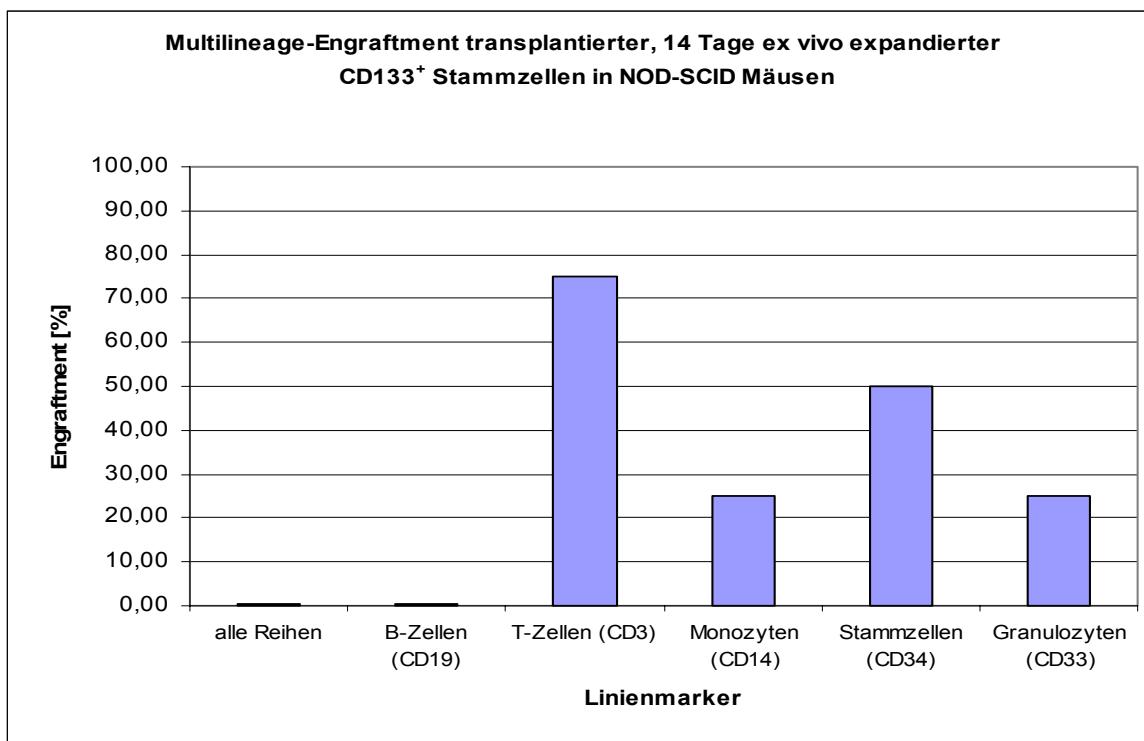
Abbildung 23 veranschaulicht dieses Ergebnis. Bei drei der fünf Mäuse wurde auch der erythrozytäre Marker CD235 analysiert und alle Tiere zeigten humane erythrozytäre Vorläuferzellen in ihrem Knochenmark.



**Abbildung 23: Multilineage-Engraftment transplanterter, 7 Tage ex-vivo expandierter CD133<sup>+</sup> Stammzellen in NOD-SCID Mäusen.** Darstellung des Prozentsatzes der Mäuse, in deren Knochenmark die humanen Zellen der jeweiligen Blutzelllinie nachweisbar waren (je  $5 \times 10^6$  Zellen transplantiert; n=5).

Von den mit 14 Tage expandierten Stammzellen transplantierten Mäusen zeigte sich bei keinem von insgesamt vier Tieren eine Expression aller humanen leukozytären Linienmarker im Knochenmark. Bei keinem der Tiere waren menschliche B-Zellen nachweisbar. 75% der Tiere hatten humano T-Zellen in ihrem Knochenmark, 50% Stammzellen und 25% Monozyten. Bei 75% der Tiere

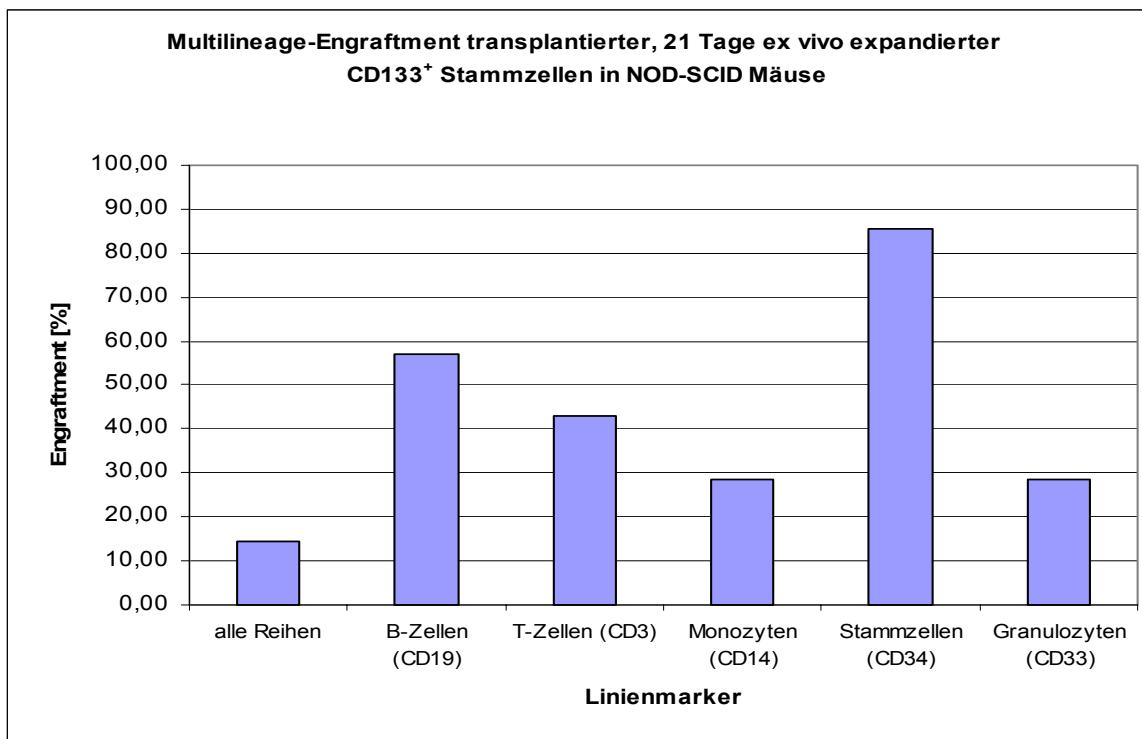
wurde Glykophorin A nachgewiesen. Das Transplantationsergebnis für die Leukozytenmarker ist in Abbildung 24 gezeigt.



**Abbildung 24: Multilineage-Engraftment transplantiert, 14 Tage ex-vivo expandierter CD133<sup>+</sup> Stammzellen in NOD-SCID Mäusen.** Darstellung des Prozentsatzes der Mäuse, in deren Knochenmark die humanen Zellen der jeweiligen Blutzelllinie nachweisbar waren (je  $5 \times 10^6$  Zellen transplantiert; n=4).

Betrachtet man die mit 3 Wochen expandierten Stammzellen behandelten Mäuse, so zeigt sich, dass bei einem von insgesamt 7 Tieren das Anwachsen aller Leukozyten-Linien nachweisbar war. 86% der Tiere zeigten humanes Stammzell-Engraftment, 57% zeigten humane T-Zellen, 29% zeigten humane Granulozyten und Monozyten. 4 von 4 auf humanes Glykophorin A untersuchte Tiere zeigten menschliche Zellen mit diesem Marker.

In der Abbildung 25 ist das Anwachsen humaner Zellen der verschiedenen Reihen des weißen Blutbildes bei mit 21 Tagen expandierten Stammzellen transplantierten Mäusen grafisch dargestellt.

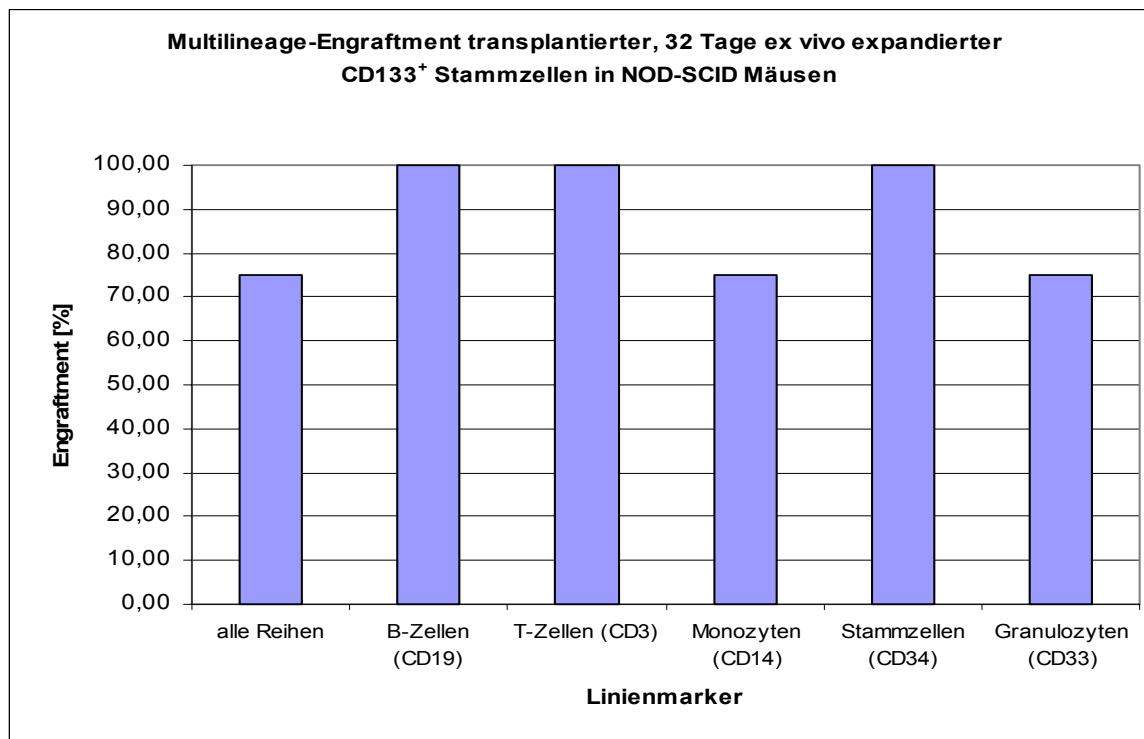


**Abbildung 25: Multilineage-Engraftment transplantiert, 21 Tage ex-vivo expandierter CD133<sup>+</sup> Stammzellen in NOD-SCID Mäusen.** Darstellung des Prozentsatzes der Mäuse, in deren Knochenmark die humanen Zellen der jeweiligen Blutzelllinie nachweisbar waren (je  $5 \times 10^6$  Zellen transplantiert; n=7).

Die Mäuse, die mit den über vier Wochen in Zellkultur vermehrten Stammzellen transplantiert wurden, zeigten zu 75% ein Anwachsen von menschlichen T-Zellen, B-Zellen, Stammzellen, Monozyten und Granulozyten. Bei allen untersuchten Tieren waren humane B-Zellen, T-Zellen und Stammzellen nachweisbar. Eines von drei behandelten Tieren zeigte keine menschlichen Monozyten und keine Granulozyten in seinem Knochenmark. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 26 dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Repopulationskompetenz der transplantierten Stammzellen nach einer Woche und nach 4 Wochen ex-vivo Kultur am größten war.

Das entscheidende Ergebnis der Transplantationsversuche war, dass es mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Kulturbedingungen gelang, multipotente, repopulationskompetente Stammzellen über einen Zeitraum von mehr als 4 Wochen ex-vivo zu kultivieren.



**Abbildung 26: Multilineage-Engraftment transplantiert, 32 Tage ex-vivo expandierter CD133<sup>+</sup> Stammzellen in NOD-SCID Mäusen.** Darstellung des Prozentsatzes der Mäuse, in deren Knochenmark die humanen Zellen der jeweiligen Blutzelllinie nachweisbar waren (je  $5 \times 10^6$  Zellen transplantiert; n=3)

Nachdem die phänotypischen und funktionellen Endothel- und Stammzell-eigenschaften der ex-vivo expandierten Zellen untersucht worden waren, sollte festgestellt werden, ob diese Zellen die Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2 exprimierten. Mit Hilfe der quantitativen PCR sollte außerdem festgestellt werden, ob und wie sich die Expressionsstärke dieser Gene in den ex-vivo Kulturen veränderte.

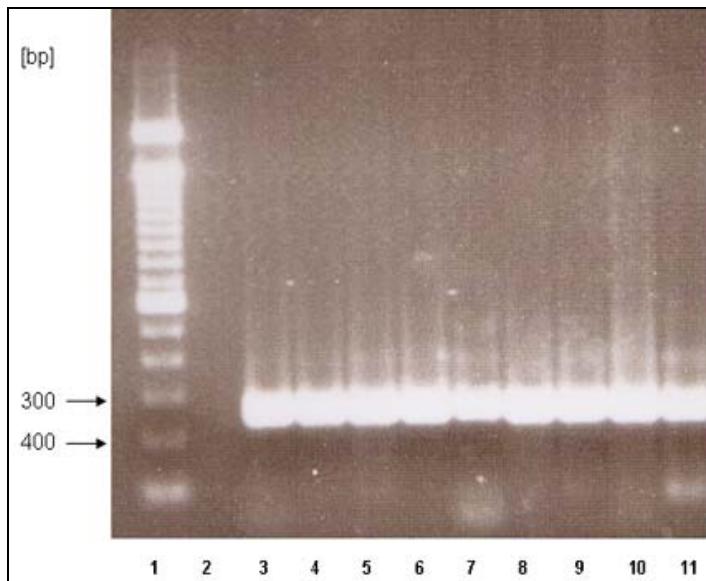
## **5.6 REAL-TIME PCR-ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN SCL UND GATA-2 IN EX-VIVO EXPANDIERTEN STAMMZELLEN**

Die von Hämangioblasten exprimierten Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2 wurden mit der Real-Time PCR und einer relativen, SYBR-Green basierten Quantifizierungsmethode untersucht. Die dargestellten relativen Mengen von GATA-2 und SCL beziehen sich auf die Expression dieser mRNA in HUVECs und wurden mit Hilfe der publizierten  $\Delta\Delta CT$ -Methode, die im Material und Methoden Teil der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde (s. 4.13, S. 52 ff.), berechnet (Livak und Schmittgen, 2001). Alle relativen cDNA-Mengen wurden auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH normalisiert.

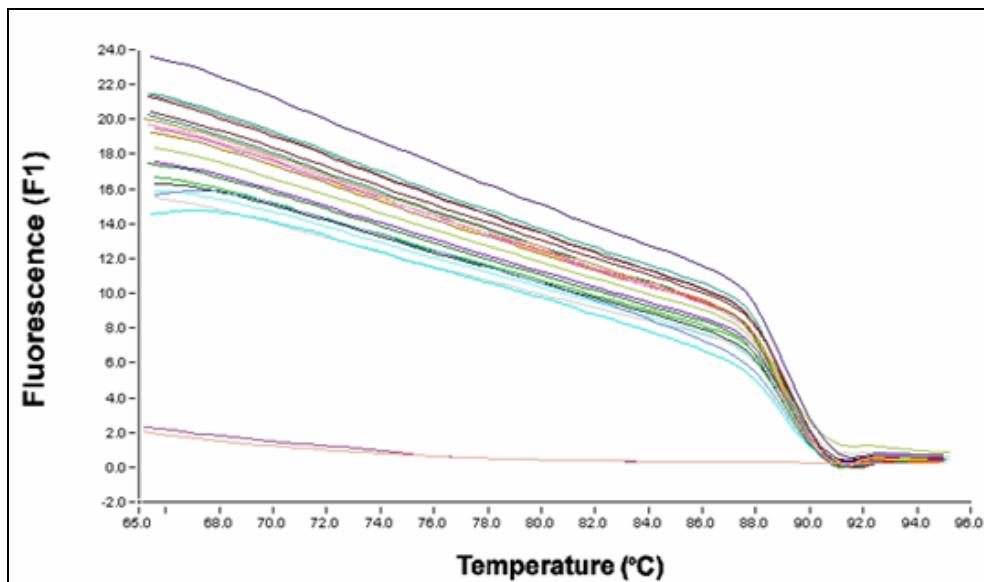
Die Expression von SCL und GATA-2 wurde an frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen von 6 Spendern, an 14 Tage ex-vivo kultivierten Zellen von 5 Spendern und an 28 und 33 Tage kultivierten Zellen von 2 Spendern untersucht.

Abbildung 27 zeigt exemplarisch ein Agarosegel einer quantitativen GAPDH-PCR. Abbildung 28 und Abbildung 29 zeigen eine Schmelzpunktanalyse und Abbildung 30 eine Quantifizierung der Proben. Da die Proben nach 40 Zyklen PCR-Reaktion auf das Gel geladen wurden, das in Abbildung 27 dargestellt ist, repräsentieren sie die Plateauphase der PCR. Die DNA-Menge war deshalb bei allen Proben ungefähr gleich groß.

Im Unterschied dazu wurde bei der quantitativen PCR, deren Ergebnis in Abbildung 30 dargestellt ist, der Beginn der linearen Amplifikationsphase der PCR erfasst. Deshalb war bei der quantitativen PCR ein Rückschluss auf die Templatemenge möglich. Auf der Abbildung 31 und in Tabelle 17 ist die relative Expression von SCL und GATA-2 in den frisch isolierten und ex-vivo expandierten Stammzellen dargestellt.



**Abbildung 27:** 2% Agarose-Gel einer quantitativen GAPDH PCR (Spur 1, Marker; Spur 2, Wasserkontrolle; Spur 3, HUVECs; Spur 4-5, CD133<sup>+</sup> d0; Spur 6-11, Stammzellen nach 14 Tagen ex-vivo Expansion).



**Abbildung 28:** Schmelzkurve der quantitativen GAPDH-PCR mit HUVECs, Stammzellen (d0 und d14 Expansion) und Wasserkontrollen. Die Fluoreszenz F1 ist über der Temperatur aufgetragen. Die PCR-Amplifikate denaturierten bei einer spezifischen Temperatur, was zu einem Fluoreszenzabfall führte, da SYBR-Green nur an doppelsträngige DNA bindet.

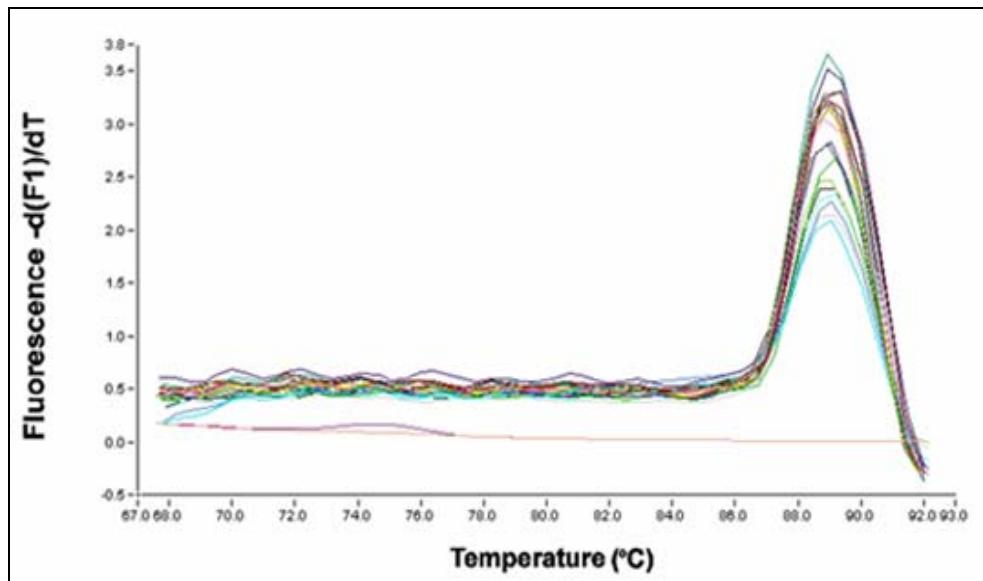


Abbildung 29: Schmelzpunkte der quantitativen GAPDH-PCR-Produkte mit HUVECs, Stammzellen (d0 und d14 Expansion) und Wasserkontrollen. Der Schmelzpunkt der PCR-Produkte betrug ca. 90°C und es waren keine unspezifischen Amplifikate vorhanden. Durch Vergleich mit dem Agarose-Gel zeigte sich, dass dieser Schmelzpunkt der Fragmentgröße des GAPDH-Amplifikates entsprach.

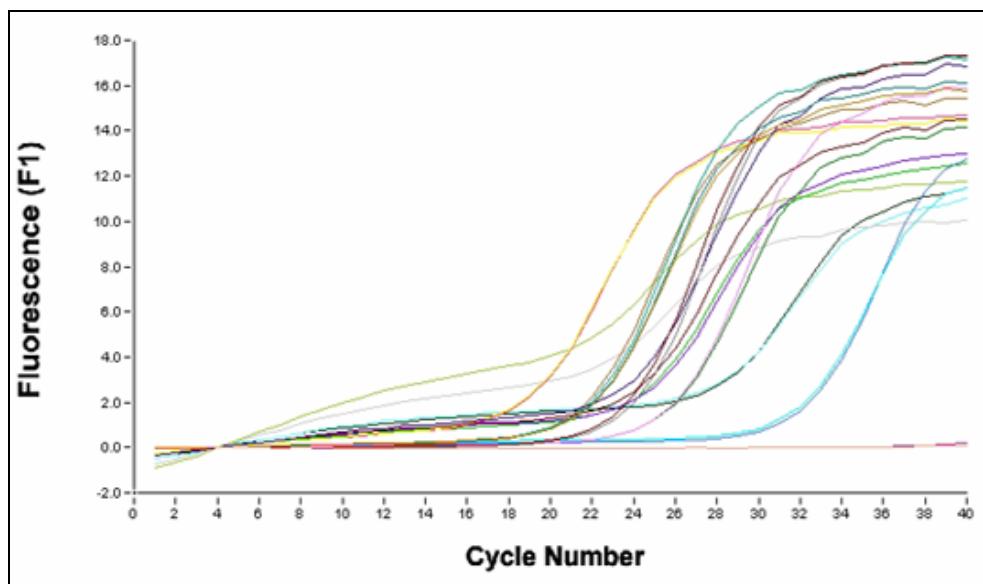
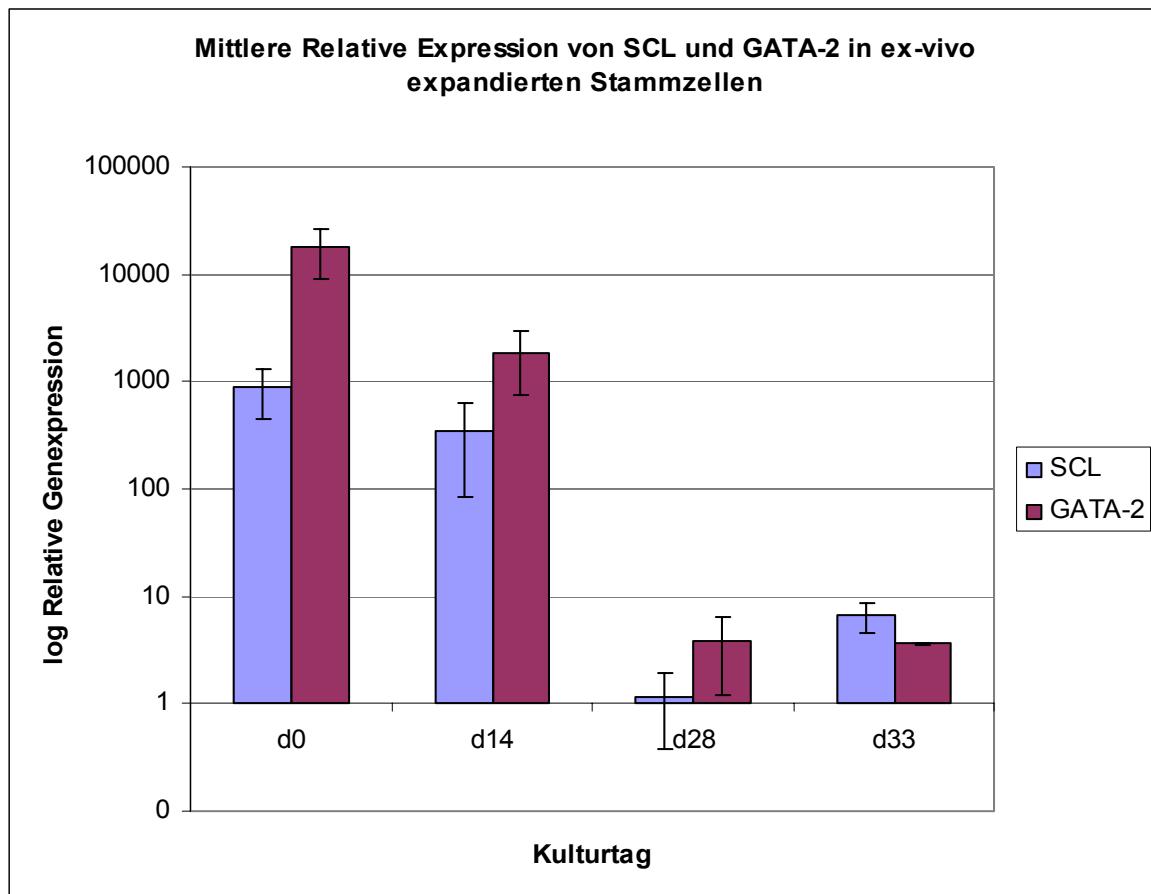


Abbildung 30: Grafische Darstellung der Fluoreszenz der einzelnen PCR-Reaktionen (GAPDH-PCR mit HUVECs, Stammzellen (d0 und d14 Expansion) sowie Wasserkontrollen) über der Zykluszahl. Der für die Quantifizierung entscheidende Crossing-Point ist der Zyklus, nach dem die gemessene Fluoreszenz über das Hintergrundrauschen ansteigt.

**Tabelle 17: Relative Quantifizierung von SCL und GATA-2 in frisch isolierten, 14, 28 und 33 Tage ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen (Expression in HUVECs = 1000)**

Kulturtag	Mittlere Expression SCL ± Standardfehler	Mittlere Expression GATA-2 ± Standardfehler
d0 (n=6)	879 ± 429	18055 ± 8930
d14 (n=5)	353 ± 269	1878 ± 1122
d28 (n=2)	1 ± 0,8	4 ± 2,6
d33 (n=2)	7 ± 2,1	4 ± 0,04



**Abbildung 31: Logarithmische Darstellung der relativen Quantifizierung von SCL und GATA-2 in frisch isolierten, 14, 28 und 32 Tage ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen.** Die relative Expression beider Gene nahm bis Tag 33 stark ab (Expression in HUVECs=1000; d0, n=6; d14, n=5; d28, n=2; d33, n=2; ± Standardfehler).

Bei der quantitativen Analyse der Expression von SCL und GATA-2 zeigte sich, dass die Expression beider Transkriptionsfaktoren in den frisch isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen am stärksten war. Nach 33 Tagen in Expansionskultur waren im Mittel nur noch ca. 10% der expandierten Zellen CD133 positiv. Die SCL-Expression verringerte sich in diesem Zeitraum um den Faktor 126 und die Expression von GATA-2 um den Faktor 4514. Der Anteil der CD133 exprimierenden Zellen wurde nur um den Faktor 10 geringer.

Nach über vier Wochen ex-vivo Expansion exprimierte somit nur noch ein kleiner Teil der Zellen die Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2 oder die Expression wurde herunterreguliert. Bei den SCL- und GATA-2 exprimierenden Zellen könnte es sich entweder um Hämangioblasten oder um multipotente Stammzellen handeln.

Zusammenfassend lässt sich für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit feststellen, dass es mit den entwickelten experimentellen Bedingungen möglich war, humane CD133<sup>+</sup> Stammzellen in hoher Reinheit zu isolieren und ex-vivo zu expandieren. Die phänotypische Charakterisierung dieser Zellen ergab eine starke Proliferation Stammzell-, Endothelzell- und Monozytenmarker exprimierender Zellen.

Die funktionelle Charakterisierung ergab multipotente Stammzell- und Endothelprogenitoreigenschaften für über 4 Wochen kultivierte Zellen. Außerdem waren die expandierten Zellen positiv für die von Hämangioblasten und multipotenten Stammzellen exprimierten Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2.

Im folgenden Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die ex-vivo expandierten Zellen mit phänotypischen und funktionellen Stammzell- und Endothelprogenitorzelleigenschaften sich in reife Endothelzellen differenzieren können. Wegen des starken Proliferationsindexes der Zellen in den ex-vivo Kulturen stünden dann ausreichend viele Endothelzellen, die individuell für Patienten erzeugt werden könnten, zur Verfügung.

## **5.7 ENDOTHELIALE DIFFERENZIERUNG VON EXPANDIERTEN CD133 POSITIVEN ZELLEN**

Nachdem die CD133<sup>+</sup> Stammzellen 28 Tage mit Hilfe von SCGF, VEGF und FLT3L expandiert wurden, erfolgte die Induktion der endothelialen Differenzierung über 14 Tage mit Hilfe von VEGF. Im Verlauf der Differenzierungsphase änderte

sich die Morphologie der Zellen. Sie wurden adhärent, flachten sich ab und proliferierten nicht mehr. In den Kulturschalen zeigten sich zwei Populationen von Zellen: große, flache und adhärente Zellen mit typischer endothelialer Morphologie sowie kleinere, runde, nicht adhärente Zellen. Die Abbildung 32 zeigt die Morphologie der endothelialen Zellen.

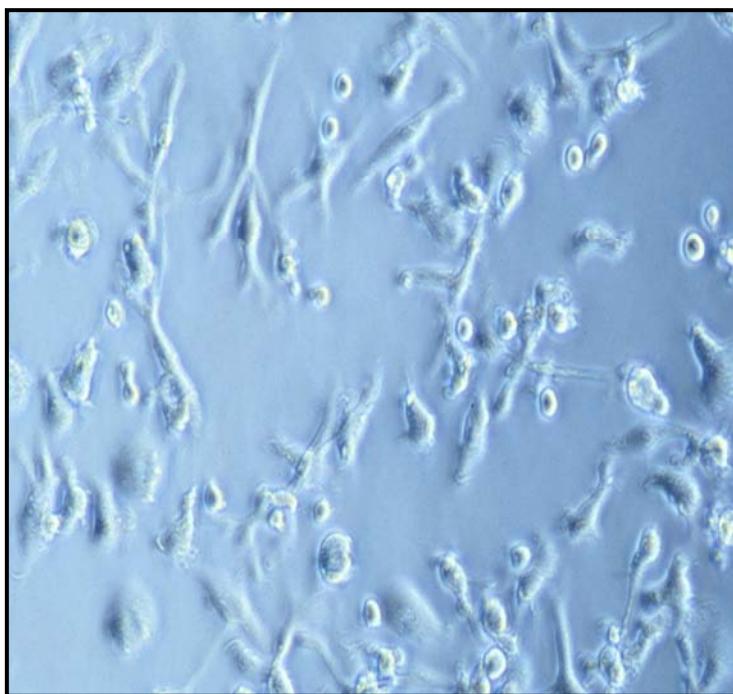


Abbildung 32: Morphologie der aus den expandierten CD133<sup>+</sup> Zellen generierten Endothelzellen (Vergrößerung 320x)

## **5.8 IN-VITRO ANALYSEN VON EXPANDIERTEN UND ENDOTHELIAL DIFFERENZIERTEN STAMMZELLEN**

### **5.8.1 IMMUNFLUORESZENZANALYSEN**

Die Expression der endothelialen Marker vWF, VE-Cadherin (CD144), Ulex-Rezeptor und CD31 wurde an frisch isolierten, an über 14 Tagen expandierten und an 14 Tage expandierten und danach für 14 Tage differenzierten Zellen untersucht. Der auf hämatopoetischen und endothelialen Zellen sowie auf Hämangioblasten exprimierte Rezeptor KDR wurde während der Expansionskultur an Tag 6 und Tag 14 untersucht und während der Differenzierungskultur an Tag 3, Tag 9 und Tag 14. Immunfluoreszenzanalysen von isolierten, expandierten und

endothelial differenzierten Stammzellen wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

**Tabelle 18: Immunfluoreszenzanalysen von isolierten, expandierten und endothelial differenzierten Stammzellen zu verschiedenen Kulturzeitpunkten.** Dargestellt sind die Prozentsätze der die endothelialen Zelloberflächenmarker CD31, vWF, CD144, Ulex Rezeptor und KDR exprimierenden Zellen (n=3;  $\pm$  Standardabweichung).

Kulturtag	CD31 [%]	vWF [%]	CD144 [%]	Ulex [%]	KDR [%]
0	>99	0	0	0	<1
6 Expansion					<1
14 Expansion	>99	5 $\pm$ 0,8	0	0	11,3 $\pm$ 6,4
3 Differenzierung					50,5 $\pm$ 13,5
9 Differenzierung					82,5 $\pm$ 1,5
14 Differenzierung	>99	>99	>99	>99	87,0 $\pm$ 3,4

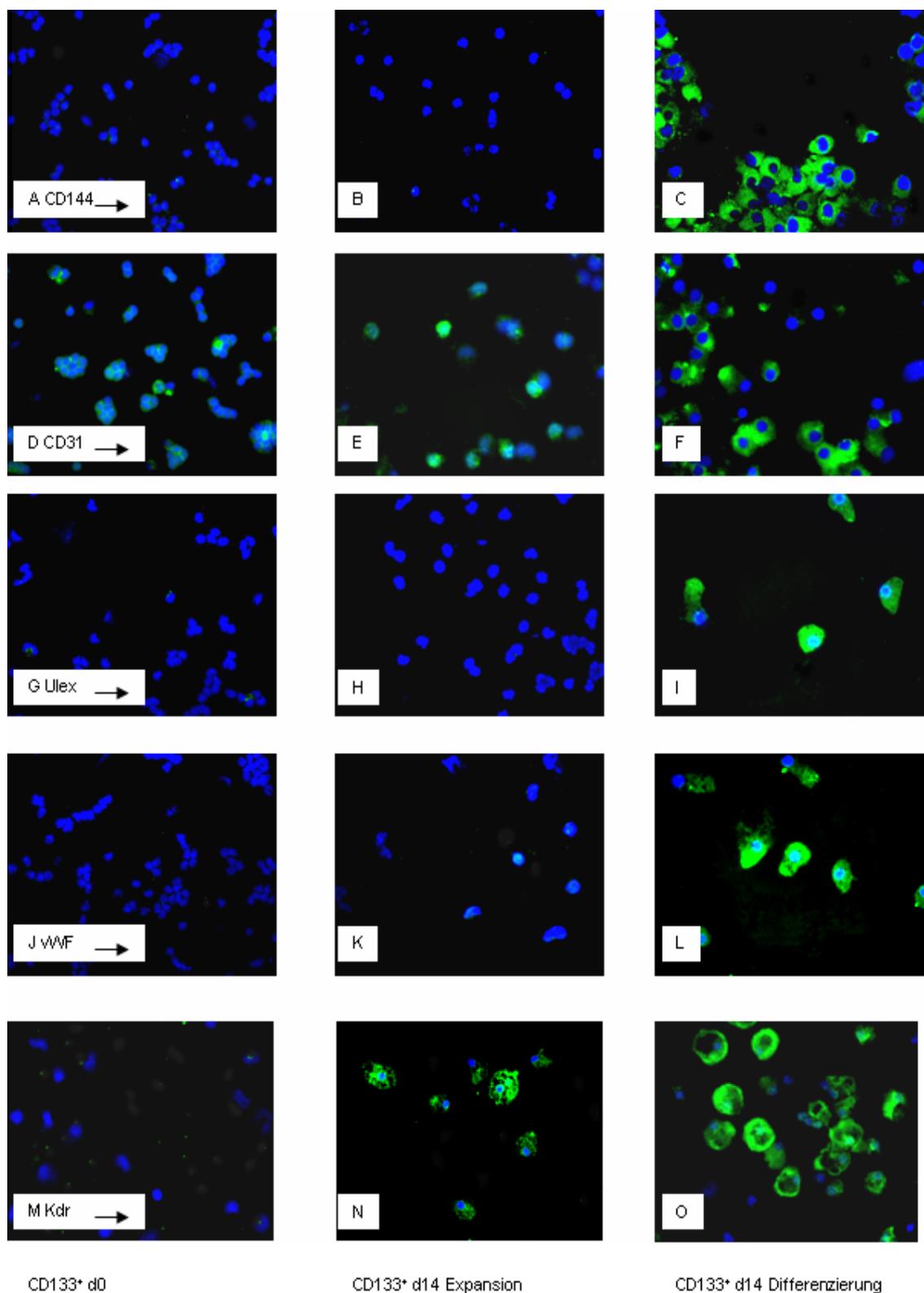
Man sieht in der Tabelle oben, dass über 99% der frisch isolierten Stammzellen den von endothelialen und hämatopoetischen Zellen exprimierten Marker CD31 auf ihrer Oberfläche trugen. Weniger als 1% der Zellen waren positiv für den von Endothelzellen, multipotenten Stammzellen und Hämangioblasten exprimierten Rezeptor KDR. Die frisch isolierten Zellen waren negativ für die endothelialen Marker vWF, VE-Cadherin und Ulex-Rezeptor. Im Verlauf der Expansionskultur stieg der Anteil der KDR-positiven Zellen auf durchschnittlich 11,3% an. CD31 wurde weiterhin von über 99% der Zellen exprimiert. 5% der Zellen trugen vWF am Expansionstag 14 auf ihrer Oberfläche. Die proliferierenden Zellen waren weiterhin negativ für Ulex-Rezeptor und VE-Cadherin.

Während der anschließenden Differenzierungskultur stieg der Anteil der KDR-positiven Zellen weiter auf durchschnittlich 87% an. Am 14. Tag der endothelialen Differenzierung waren schließlich über 99% der Zellen positiv für vWF, VE-Cadherin und Ulex-Rezeptor. Die als Negativkontrollen benutzten mononukleären Zellen gesunder Spender färbten sich mit keinem der benutzten Antikörper an.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit Hilfe des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Kultursystem möglich war, aus adulten humanen CD133<sup>+</sup> Stammzellen durch Expansionskultur und anschließende Differenzierung autologe Endothelzellen in großer Zahl herzustellen. Diese Zellen besaßen die

morphologischen und immunphänotypischen Eigenschaften von reifen Endothelzellen. Die Abbildung 33 zeigt Photos der Immunfluoreszenzanalysen. Durch die Experimente konnte gezeigt werden, dass die ex-vivo expandierten Zellen sich in morphologisch und phänotypisch charakterisierte Endothelzellen differenzieren ließen.

Die Zunahme der Expression von KDR zeigte zusätzlich, dass möglicherweise Stammzellen mit der Differenzierungskapazität in hämatopoetische und endotheliale Zellen in der Population der proliferierenden Zellen vorhanden waren. Deshalb wurde im folgenden dritten Teil der vorliegenden Arbeit die Differenzierung dieser Zellen auf Einzelzellebene untersucht.



**Abbildung 33:** Immunfluoreszenzfärbung von frisch isolierten (A, D, G, J, M), 14 Tage expandierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen (B, E, H, K, N) sowie von im Anschluss an die Expansion für 14 Tage differenzierten Endothelzellen (C, F, I, L, O); (A-C, Maus anti-human CD144; D-F, Maus anti-human CD31; G-I, Maus anti-human Ulex; J-L, Maus anti-human KDR; alle mit Ziege anti-Maus-FITC als sekundärem Antikörper gefärbt; n=3; Vergrößerung 100x).

## **5.9 RETROVIRALE TRANSDUKTION VON CD133 POSITIVEN ZELLEN**

Zur Untersuchung der Differenzierungskapazität der ex-vivo expandierten Zellen auf Einzelzellebene sollten diese Zellen zuerst stabil retroviral mit dem grün fluoreszierenden Markergen transduziert werden.

Die proliferierenden Stammzellen wurden unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten und unter 4.16 (s. S. 57 ff.) beschriebenen Bedingungen mit Hilfe von Herrn PD Dr. B. Fehse retroviral transduziert. Der Beginn der Infektionen erfolgte am Kulturtag 4. Für die in-vitro Analysen auf Einzelzellebene wurden 2 Transduktionszyklen durchgeführt, um möglichst vitale Zellen zu erhalten. 5 Transduktionszyklen erfolgten, um zu untersuchen, wie hoch die maximale Transduktionseffizienz im Hinblick auf mögliche zukünftige Gentransferstudien war. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der retroviralen Transduktionen.

**Tabelle 19: Transduktionseffizienzen der proliferierenden Stammzellen.** Die CD133<sup>+</sup> Stammzellen wurden am 4. Tag der ex-vivo Kultur mit dem retrovirkalen Vektor SF11αEGFP transduziert. Die Transduktionseffizienz wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt.

<b>Spender</b>	<b>2 Transduktionszyklen GFP-positive Zellen [%]</b>	<b>5 Transduktionszyklen GFP-positive Zellen [%]</b>
S1	22,7	35
S1	9,7	-
S3	22,1	67,8
S4	16,4	62,3
S5	37,9	73,4
S6	21,8	56,7
S7	18,6	-
S8	30,8	-
S9	8	-
S10	4	-
S11	1,5	-
S12	20	-
S13	42	-
S14	10,1	-
<b>Mittelwert</b>	<b>19</b>	<b>59</b>

Die mittlere Transduktionseffizienz betrug bei zwei Infektionszyklen 19% mit einem minimalen Wert von 1,5% und einem Maximalwert von 42%. Bei fünf Infektionszyklen lag die mittlere Transduktionseffizienz bei 59% mit einem Minimum von 35% und einem Maximum von 73,4%.

Die retrovirale Transduktion der proliferierenden Zellen führte zu keiner Änderung der Zellmorphologie. Abbildung 34 zeigt die proliferierenden und stabil mit GFP transduzierten Stammzellen. Die grüne GFP-Fluoreszenz wurde auch durchflusszytometrisch nachgewiesen und diente gleichzeitig als Markierung für das FACS-basierte Sortieren von einzelnen, grünen Zellen in die Mikrotiterplatten. Abbildung 35 zeigt eine exemplarische, durchflusszytometrische Analyse von transduzierten Stammzellen als Histogramm und Dot Plot dargestellt. Beim Sortieren wurden einzelne Zellen der Region R2 in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte sortiert. Die erfolgreiche Transduktion mit dem grün fluoreszierenden Markogen GFP machte die Analyse der Differenzierungskapazität einer einzelnen Stammzelle in die endotheliale und hämatopoetische Richtung möglich.

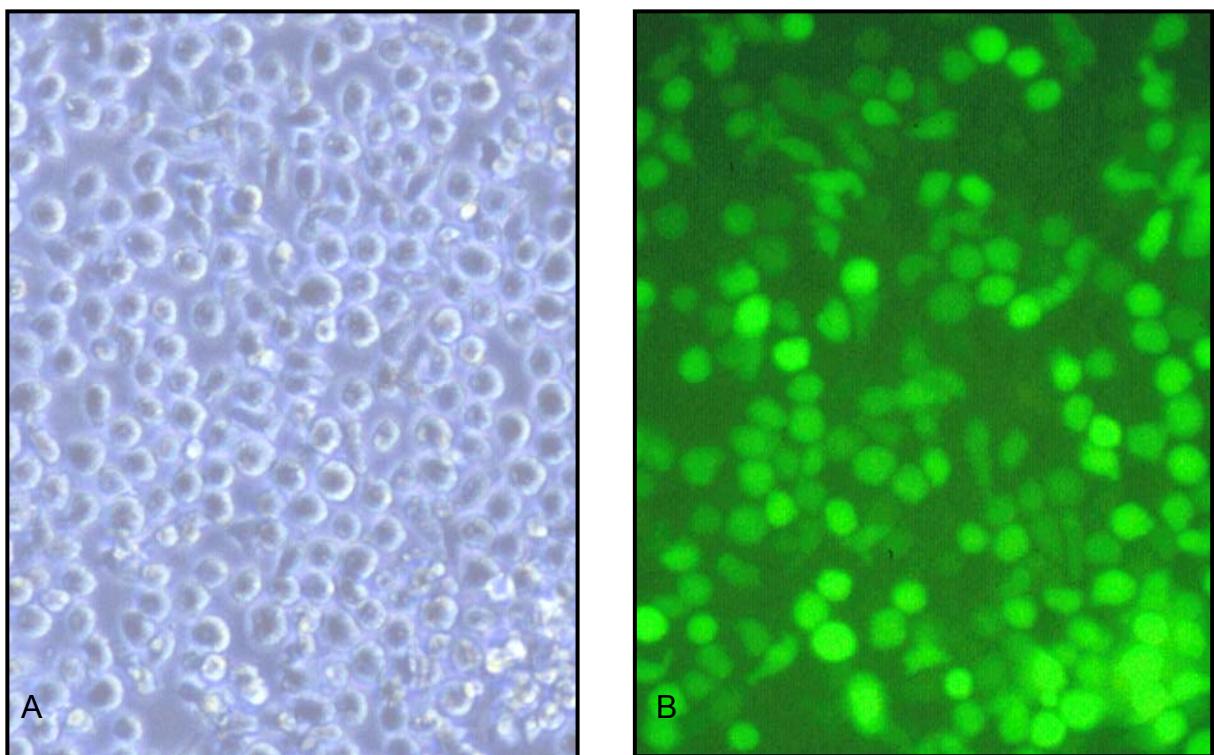
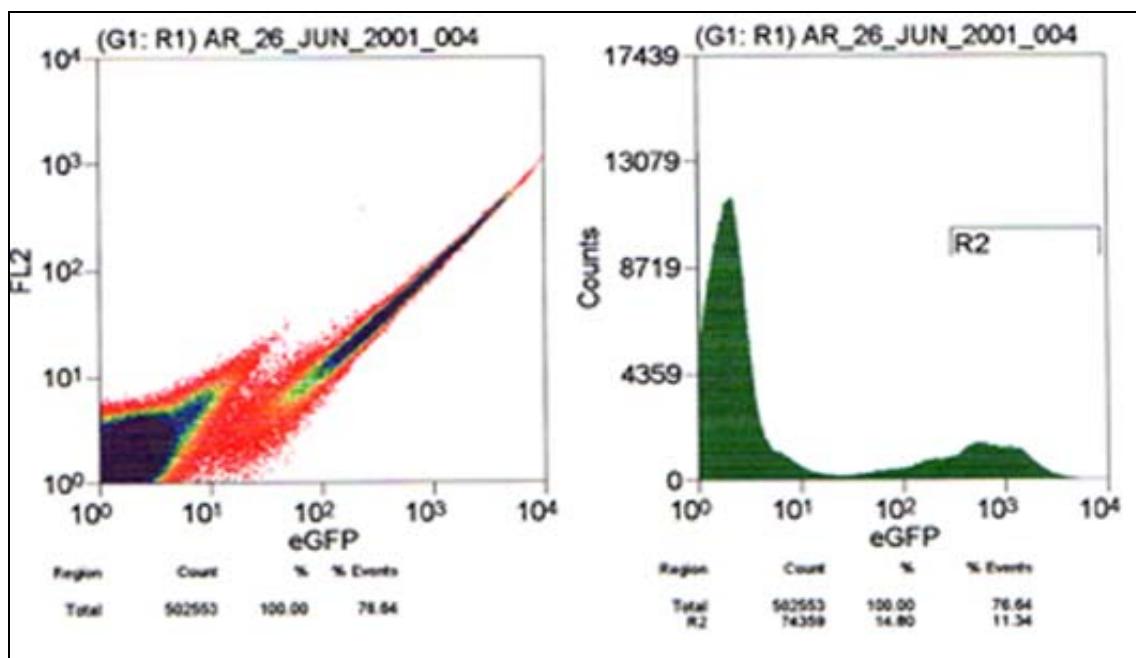


Abbildung 34: Morphologie der proliferierenden, mit eGFP stabil transduzierten Stammzellen (A: Durchlicht, B: UV-Licht; Vergrößerung 320x).



**Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse von eGFP-transduzierten Stammzellen als Histogramm und Dot Plot.** Einzelne Zellen der Region R2 wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte sortiert.

### 5.10 ANALYSE DER DIFFERENZIERUNGSKAPAZITÄT VON STAMMZELLEN AUF EINZELZELLEBENE: NACHWEIS DES POSTNATALEN HÄMANGIOBLASTEN

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob im adulten humanen Organismus Stammzellen vorkommen, wurden proliferierende CD133<sup>+</sup> Zellen retroviral mit dem grün fluoreszierenden Marker-GFP transduziert. Damit wurde es möglich, die Nachkommen einer einzelnen Zelle unter hämatopoetischen und endothelialen Differenzierungsbedingungen zu verfolgen. Mit Hilfe von blauen (DAPI) und roten (Texas Red) Fluoreszenzfarbstoffen konnten dann die DNA des Zellkerns sowie endothiale bzw. hämatopoetische Marker auf der Oberfläche der grünen Zellen gegengefärbt werden.

Es wurden 283 durch Limiting Dilution erzeugte Stammzellklone in sieben unabhängigen Experimenten untersucht. 1440 einzelne Zellen von fünf verschiedenen Spendern wurden mit Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zell-Sortings erzeugt. Von den durch Limiting Dilution vereinzelten Stammzellen verdoppelten sich 6,7% mindestens fünfmal und erreichten die für die Analysierbarkeit kritische Grenze von 30 Zellen. In den durch FACS-Sorting gewonnenen Einzelzellkulturen

proliferierten keine Zellen ausreichend. Die schonendere Methode der Limiting Dilution zeigte sich somit in der vorliegenden Arbeit dem FACS-Sorting deutlich überlegen.

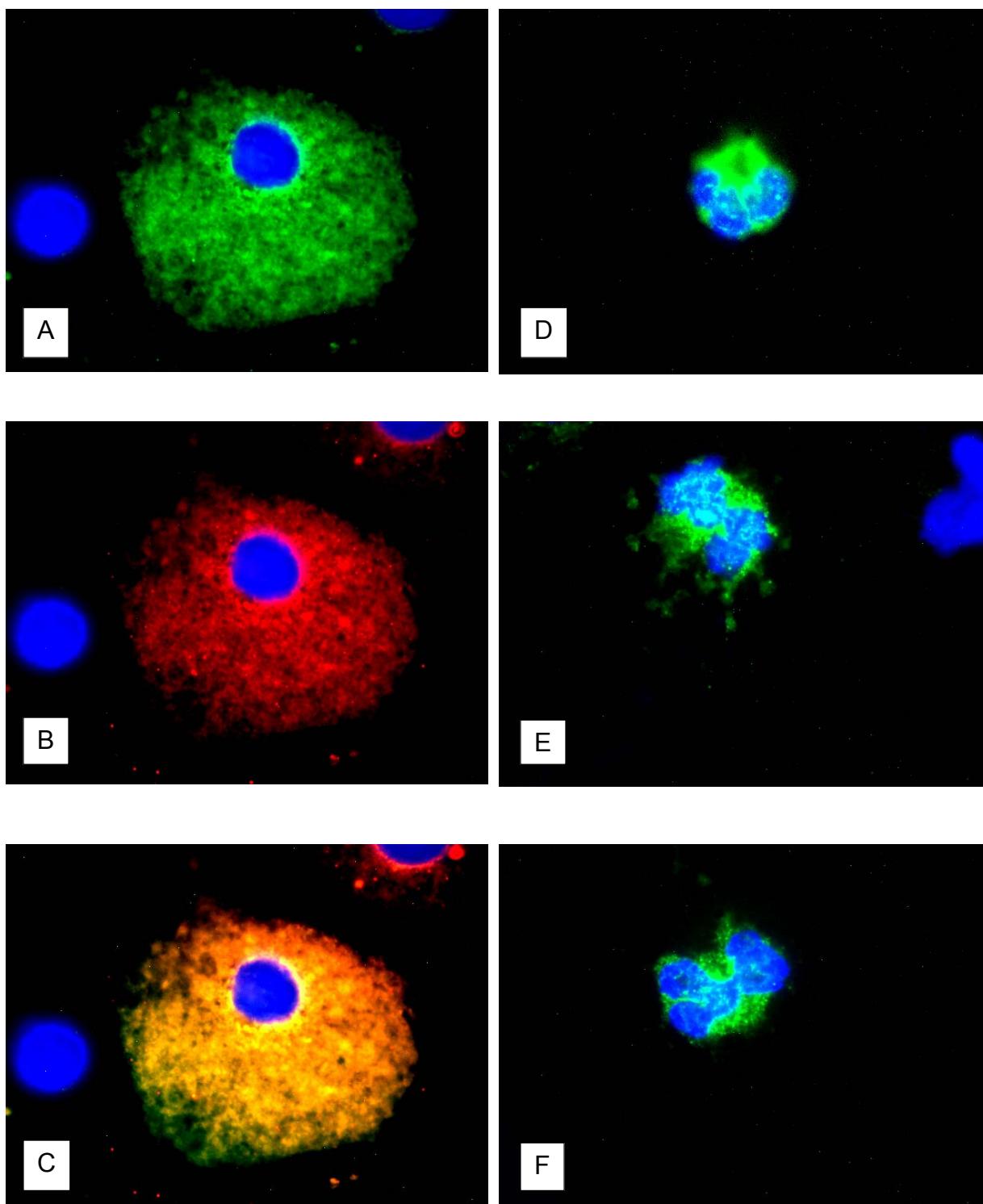
Von den 19 aus den 283 entstandenen proliferierenden Klonen differenzierten 5 Klone in die hämatopoetische und in die endothiale Richtung. Das bedeutet, dass 1,77% der einzelnen untersuchten Zellen hämangioblastische Potenz hatten. Tabelle 20 gibt einen Überblick über die proliferative und hämangioblastische Potenz der untersuchten Stammzellen der 7 Spender.

**Tabelle 20: Proliferative und hämangioblastische Potenz der auf Einzelzellebene untersuchten Stammzellen (n=7).**

Spender	Zahl der untersuchten Einzelzellkulturen	Einzelzellkulturen mit proliferativer Potenz von über 5 Verdopplungen	Einzelzellkulturen mit hämangioblastischer Potenz
S1	51	2	0
S4	27	3	2
S6	20	5	2
S7	32	3	1
S9	65	4	0
S10	41	2	0
S11	47	0	0
<b>gesamt</b>	<b>283</b>	<b>19 (6,7%)</b>	<b>5 (1,77%)</b>

Die Abbildung 36 zeigt GFP-positive segmentkernige Granulozyten und eine GFP- und VE-Cadherin-positive Endothelzelle. Diese Zellen haben sich aus einer einzelnen GFP-transduzierten Ursprungszelle, einem Hämangioblasten, differenziert. Der nur in Granulozyten vorkommende trommelschlegelförmige Kern ist auf der Abbildung 36 D-F deutlich zu erkennen.

Die Spezifität der Immunfluoreszenzfärbung wird auf der Abbildung 36 A-C deutlich, in der zusätzlich zu der GFP- und VE-Cadherin-positiven Zelle noch eine GFP-negative VE-Cadherin-positive und eine GFP-negative VE-Cadherin-negative Zelle dargestellt sind. Da VE-Cadherin der einzige bekannte endothelspezifische Marker ist, werden die positiven Zellen eindeutig als Endothelzellen klassifiziert.

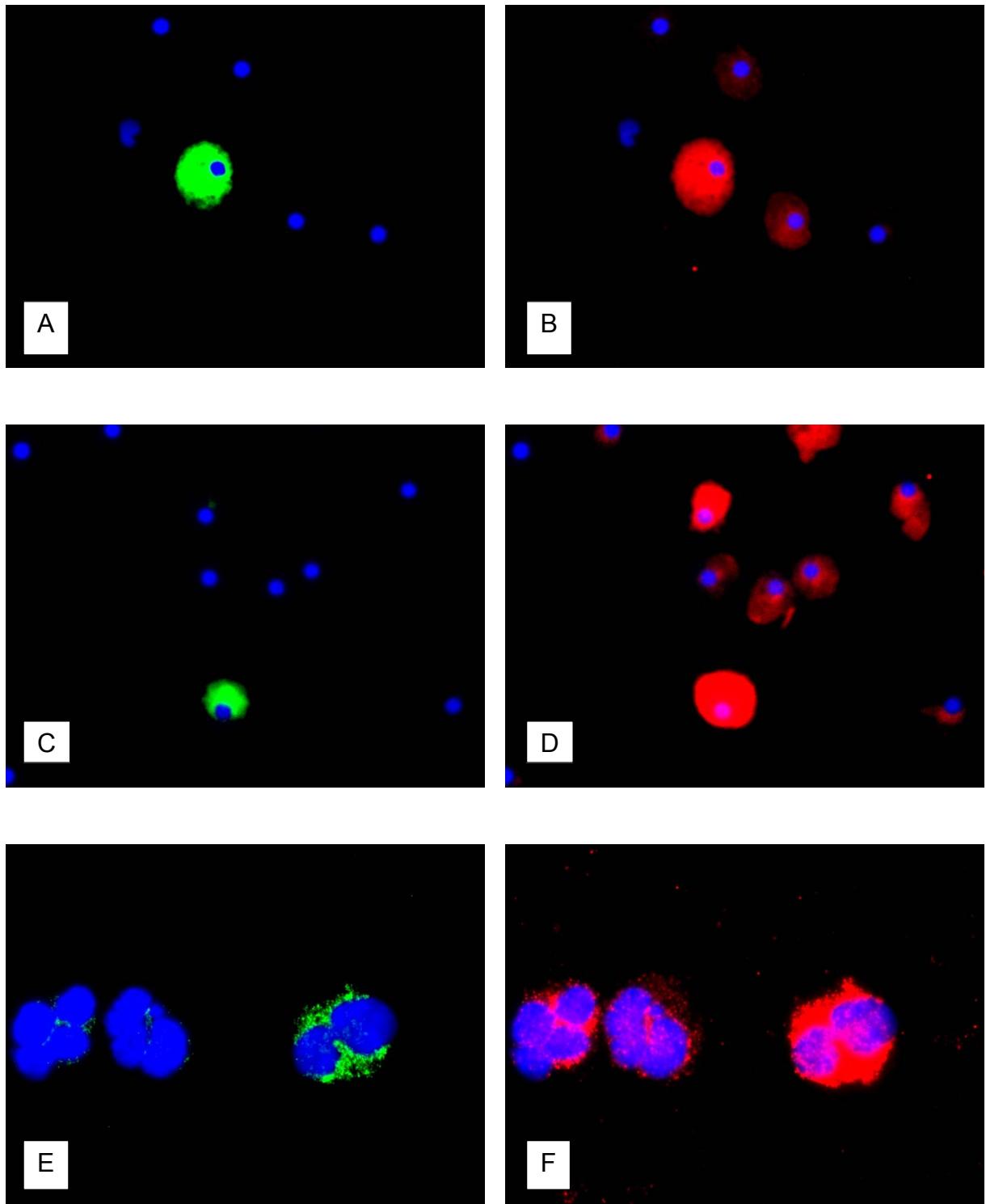


**Abbildung 36: Aus einem Klon einer mit GFP transduzierten Einzelzelle (S7) differenzierte Endothelzelle (A-C) und Granulozyten mit typischem segmentiertem Kern (D-F).** A-C, eGFP-transduzierte Zelle mit Maus anti-human VE-Cadherin und anti-Maus Texas Red gefärbt; A, Grünfilter; B, Rotfilter; C, Überlagerung der Filter; D-F, mit eGFP transduzierte Granulozyten; Vergrößerung 1000x.

Um die aus einer gemeinsamen Ursprungszelle unter hämatopoetischen und endothelialen Differenzierungsbedingungen entstandenen Granulozyten und Endothelzellen noch weiter zu charakterisieren, wurden die Marker CD13 und Ulex-Rezeptor immunzytochemisch analysiert. CD13 wird von Granulozyten exprimiert und Ulex-Rezeptor von Endothelzellen und Monozyten.

Die Abbildung 37 zeigt die aus einer Zelle differenzierten CD13-positiven Granulozyten und die für den Ulex europaeus-Rezeptor positiven Endothelzellen. Auch in dieser Abbildung zeigt sich die Spezifität der Immunfluoreszenzfärbung an den abgebildeten Ulex-Rezeptor positiven GFP-negativen und Ulex-Rezeptor-negativen GFP-negativen Zellen sowie an den CD13-positiven GFP-negativen Granulozyten. Diese Zellen haben sich aus den nicht mit GFP transduzierten Fütterzellen differenziert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im dritten Teil der vorliegenden Arbeit die Existenz von postnatalen Hämangioblasten in der ex-vivo expandierten Zellpopulation nachgewiesen wurde.



**Abbildung 37:** Aus einem Klon einer mit GFP transduzierten Einzelzelle (S4) differenzierte Endothelzellen (A-D) und Granulozyten mit typischem segmentiertem Kern (E-F). A-D, GFP-transduzierte Zelle und untransduzierte Fütterzellen mit Maus anti-human Ulex europaeus-Rhodamin gefärbt; A und C, Grünfilter; B und D, Rotfilter; E und F, GFP-transduzierte Zelle und untransduzierte Fütterzellen mit Maus anti-human CD13 und Ziege anti-Maus Texas Red gefärbt; Vergrößerung A-D, 100x; Vergrößerung E und F, 1000x.

## 6 DISKUSSION

Die ex-vivo Expansion von humanen hämatopoetischen Stammzellen hat große klinische Relevanz, da in vielen Situationen nicht genügend Stammzellen für die Patienten zur Verfügung stehen. Zum Beispiel werden autologe Stammzellen von Krebspatienten vor einer intensiven knochenmarktoxischen Chemotherapie isoliert, um sie nach der myeloablativen Chemotherapie dem Patienten zu reinfundieren. Zur Gewinnung der Stammzellen wird das Blut der Patienten mittels einer Durchlaufzentrifuge prozessiert. Damit werden die Stammzellen aus ca. 7 Litern Blut aufgereinigt. Durch das große Blutvolumen besteht ein hohes Kontaminationsrisiko durch Tumorzellen. Deshalb wäre es günstig, durch eine Expansion von Stammzellen das zu prozessierende Volumen drastisch zu verringern. Außerdem ließen sich durch die Expansion genügend Stammzellen für mehrere Transplantationen gewinnen.

Bis zum heutigen Zeitpunkt besteht ein großes klinisches Problem darin, humane hämatopoetische Stammzellen in-vitro zu kultivieren, ohne dass es zum Verlust des Stammzellpotenzials kommt. So führte in einer prominent publizierten Arbeit die Reinfusion ex-vivo expandierter Stammzellen zu einer raschen Regeneration der Hämatopoiese. Nach drei Monaten war diese Hämatopoiese jedoch erschöpft und die Patienten mussten mit kryokonserviertem Reserveknochenmark behandelt werden (Brugger et al., 1995).

Das zugrunde liegende Problem der ex-vivo Expansion bestand darin, dass die Stammzellen in Zellkultur irreversibel in Progenitorzellen ausdifferenzierten und ihre Stammzelleigenschaften verloren. Deshalb lag ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in der Entwicklung von Kulturbedingungen zur ex-vivo Expansion von multipotenten CD133 positiven Stammzellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst CD133<sup>+</sup> Stammzellen aus Leukaphereseprodukten in hoher Reinheit isoliert werden. Diese Zellen sollten anschließend ex-vivo expandiert werden und dann bezüglich ihrer Differenzierungskapazität in die endotheliale und hämatopoetische Richtung untersucht werden. Ein Ziel bestand darin, Endothelzellen in großer Zahl für eine mögliche therapeutische Anwendung zu generieren. Weiterhin sollte auf Einzelzellebene

untersucht werden, ob in der adulten Zellpopulation der ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup> Zellen Hämangioblasten vorhanden waren.

Humane CD133<sup>+</sup> Stammzellen wurden als Ausgangspopulation gewählt, weil es Hinweise darauf gab, dass CD133<sup>+</sup> Zellen weniger linienkommtierte Progenitorzellen enthalten als CD34<sup>+</sup> Zellen (Gallacher et al., 2000). CD133 wird von embryonalen Stammzellen und Stammzellen nicht hämatopoetischer Gewebe ohne Koexpression von CD34 exprimiert (Jiang et al., 2002; Kaufman et al., 2001; Uchida et al., 2000). Von unserer Gruppe wurde gezeigt, dass CD133<sup>+</sup> Zellen sich in-vitro und in-vivo in funktionale Endothelzellen differenzieren konnten (Gehling et al., 2000). CD133<sup>+</sup> Zellen besitzen folglich ein großes Differenzierungspotenzial und deshalb möglicherweise auch ein großes therapeutisches Potenzial.

Ein weiterer Grund für die Verwendung von CD133<sup>+</sup> Zellen als Ausgangspopulation war, dass bei adulten Mäusen bereits Hämangioblasten in der Population der CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen wurden (Choi et al., 1998). Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit im humanen System untersucht werden, ob vergleichbare Zellen nachgewiesen werden konnten.

Es wurden CD133<sup>+</sup> Zellen von insgesamt 27 Spendern verwendet. Sie wurden zu hoher Reinheit von im Mittel 98% aufgereinigt (94,1-99,9%). Die Reinheit der isolierten Zellen war damit größer als in den vorher von unserer und anderen Gruppen publizierten Daten.

Unsere Gruppe erzielte bei der Aufreinigung von CD133<sup>+</sup> Zellen bisher eine 72%ige Anreicherung dieser Zellen, während Vavrova et al. über eine Reinheit von 85% der mit Hilfe von paramagnetischen Partikeln isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen berichteten (Gehling et al., 2000; Vavrova et al., 1999).

Die von uns erreichte Verbesserung der Aufreinigung auf Werte zwischen 94,1 und 99,9% könnte darauf zurückzuführen sein, dass eine hochspezifische, automatisierte Selektionsstrategie mit Hilfe des Auto-MACS etabliert wurde, bei der die markierten Zellen zweimal magnetisch selektioniert wurden.

In einer neueren Veröffentlichung wurden mit einer vergleichbaren, automatisierten Methode ähnliche Ergebnisse bei der Isolation von CD133<sup>+</sup> Zellen erzielt (mittlere Reinheit von 94%) (Gordon et al., 2003).

In den folgenden Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden Kulturbedingungen zur ex-vivo Expansion der isolierten CD133<sup>+</sup> Zellen entwickelt. Dazu wurde ein bereits in der Arbeitsgruppe zur Stammzellkultur etabliertes Grundmedium mit Pferdeserum, FKS und Hydrokortison in IMDM benutzt. Diesem Grundmedium wurden die humanen Zytokine SCGF, VEGF und FLT3L zugesetzt. Nach 3 Kulturtagen zeigte sich eine deutlich sichtbare Zellproliferation.

Die folgende Analyse der Proliferationskinetik ergab eine sehr starke Zellzahlzunahme in den Expansionskulturen. Der Faktor für den mittleren Anstieg der absoluten Zellzahl betrug in der ersten Woche ca. 2, in der 2. Woche 26, in der 3. Woche 130, in der 4. Woche 939 und in der 5. Woche 2190.

Für die drei im Rahmen der vorliegenden Arbeit als optimal für die Proliferation von CD133<sup>+</sup> Stammzellen ermittelten Zytokine SCGF, VEGF und FLT3L belegen Literaturdaten, dass sie jeweils alleine eingesetzt die Proliferation und das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen fördern. Die Kombination dieser drei Faktoren zur ex-vivo Expansion von multipotenten Stammzellen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben.

Leary et al. zeigten, dass die Inkubation mit SCF den Eintritt von CD34<sup>+</sup> Stammzellen in den Zellzyklus beschleunigte (Leary et al., 1992). SCF allein konnte außerdem die langzeitrepopulierende Aktivität von unreifen murinen Stammzellen aufrechterhalten, induzierte aber nicht die Proliferation dieser Zellen (Li und Johnson, 1994).

Neuere Daten zeigen, dass VEGF und sein Rezeptor KDR eine entscheidende Rolle für das Überleben nicht nur von endothelialen Zellen und Hämangioblasten, sondern auch von hämatopoetischen Stammzellen spielen (Gerber et al., 2002; Larrivee et al., 2003).

Kabrun et al. beschrieben, dass KDR von einer Untergruppe hämatopoetischer Progenitorzellen exprimiert wurde. Konditioniertes Knock-out beider VEGF-Allele in murinen hämatopoetischen Stammzellen zerstörte deren Fähigkeit, NOD-SCID Mäuse zu repopulieren und verschiedene hämatopoetische Kolonien in semisoliden Medien zu bilden. Wurde nur ein VEGF-Allel ausgeschaltet, konnten diese Stammzellen die Hämatopoese in den myeloabladierten Tieren rekonstituieren und multipotente, hämatopoetische Kolonien bilden (Kabrun et al., 1997).

Die Aktivierung von KDR führte sogar in Abwesenheit von Zytokinen zum Überleben von multipotenten hämatopoetischen Progenitoren (Larrivee et al., 2003).

Von unserer Arbeitsgruppe wurde die Proliferation von CD133<sup>+</sup> Zellen unter dem Einfluss von SCGF und VEGF untersucht. Die maximale Zellzahlzunahme war 8-fach nach 14 Tagen (Gehling et al., 2000).

Daraus lässt sich ableiten, dass die Zugabe des Zytokins FLT3L im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine mehr als dreifach stärkere Proliferation der CD133<sup>+</sup> Zellen induzieren konnte als SCGF und VEGF allein.

In der vorliegenden Literatur wurde beschrieben, dass humane Multilineagerepopulierende hämatopoetische Stammzellen den Rezeptor für FLT3L exprimierten und dass FLT3L das Überleben und die Proliferation dieser Zellen förderte (Petzer et al., 1996; Rappold et al., 1997; Small et al., 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, dass FLT3L im humanen System ein deutlich effizienterer Proliferationsfaktor für langzeitrepopulierende Stammzellen war als der SCGF ähnliche Wachstumsfaktor SCF (Sitnicka et al., 2003). FLT3L supprimierte außerdem Apoptose von humanen CD34<sup>+</sup> Zellen und induzierte die Proliferation von unreifen hämatopoetischen Stammzellen (Murray et al., 1999).

Piacibello et al. untersuchten die Proliferationskinetik von CD34<sup>+</sup> Zellen unter dem Einfluss von FLT3L und TPO sowie von FLT3L, TPO und SCF. Ohne SCF wurde nach 4 Wochen eine Zellzahlvermehrung um den Faktor 149 und nach 8 Wochen um den Faktor 1990 erreicht, mit SCF war die Zunahme nach 4 Wochen 445-fach und nach 8 Wochen 4550-fach (Piacibello et al., 1999). Die Proliferation der Stammzellen war somit unter dem Einfluss von SCF deutlich stärker.

Die Zunahme der Zellzahl unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Kulturbedingungen war nach 4 Wochen doppelt so stark wie bei den Daten von Piacibello et al. Nach 8 Wochen war die Proliferationsrate unter unseren Kulturbedingungen mit dem Faktor 2590 aber deutlich geringer. Ein Grund dafür könnte sein, dass der proliferationsfördernde Effekt von TPO erst relativ spät einsetzt. In einer Publikation von Yagi et al. wurde nämlich gezeigt, dass die TPO-vermittelte ex-vivo Expansion von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen erst nach 8 Wochen nachweisbar war (Yagi et al., 1999).

Die oben beschriebenen Literaturdaten und unsere eigenen Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die Kombination von VEGF, FLT3L und SCGF für die Vermehrung von unreifen hämatopoetischen Stammzellen besonders geeignet sein könnte. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die stark proliferierenden Expansionskulturen immunphänotypisch auf das Vorhandensein von multipotenten Stammzellen untersucht.

Um die Stammzelleigenschaften der proliferierenden Zellen näher zu charakterisieren, wurden durchflusszytometrische Analysen der Stammzellmarker CD133, CD34, CD90, c-kit (CD117) und CD7 durchgeführt. Mit Hilfe des zuvor bestimmten Proliferationsfaktors konnte dann die ex-vivo Expansion der jeweiligen Zellpopulation berechnet werden. Die funktionellen Stammzelleigenschaften der proliferierenden Zellen wurden in-vitro mit Hilfe von Colony-Assays und in-vivo mit NOD-SCID Repopulationsassays untersucht.

Die frisch isolierten hämatopoetischen Zellen zeigten eine starke Expression von CD133 (98,3%) und CD34 (97,8%). 15,8% der Zellen exprimierten CD90, 8,2% CD117 und 5,8% CD7. Im weiteren Verlauf der Kultur nahm die Expression von CD133 zunächst rasch bis auf 8,1% am Tag 12 ab. Danach betrug der relative Anteil der CD133 positiven Zellen 5,5% bis 14,8%. Die absolute Zellzahlzunahme der CD133<sup>+</sup> Zellen war 260-fach nach 5 Kulturwochen.

Die CD34 Expression in den Expansionskulturen hingegen nahm kontinuierlich ab und betrug am Tag 35 nur noch 1,7%. Die Population der CD34<sup>+</sup> Zellen wurde nur um den Faktor 36 expandiert. Daraus folgt, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Kulturbedingungen vor allem das Überleben und das Wachstum der CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> Zellen unterstützten.

Es gibt neuere Publikationen, die zeigen, dass CD34<sup>-</sup> Zellen existieren, die NOD-SCID Mäuse langzeitrepopulieren können (Bhatia et al., 1998; Osawa et al., 1996). Bei diesen Experimenten war die Frequenz der repopulierenden Stammzellen in der Fraktion der CD34<sup>-</sup> Zellen jedoch viel geringer als bei den CD34<sup>+</sup> Zellen und entsprach damit der für die primitivsten Stammzellen erwarteten niedrigen Frequenz (Bhatia et al., 1998). In darauf folgenden Analysen konnte die langzeitrepopulierende Aktivität der CD34<sup>-</sup> Zellen den CD133<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> Zellen zugeordnet werden (Gallacher et al., 2000).

In unseren Analysen nahm der prozentuale Anteil der CD7 exprimierenden Zellen von 5,8% am Isolationstag auf unter 1% nach 14 Tagen in Expansionskultur ab und stieg im weiteren Verlauf auch nicht wieder an. Daraus lässt sich schließen, dass unter unseren Kulturbedingungen der größte Anteil der proliferierenden CD133 exprimierenden Zellen den unreifen CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD7<sup>-</sup> Phänotyp besaßen.

Mehrere Arbeiten verschiedener Forschergruppen belegen, dass multipotente Stammzellen aus nicht hämatopoetischen Geweben sowie embryonale Stammzellen CD133 positiv und CD34 negativ sind (Jiang et al., 2002; Kaufman et al., 2001; Uchida et al., 2000).

Ob die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ex-vivo expandierten CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> Stammzellen eine ähnlich große Differenzierungskapazität wie diese Zellen besitzen, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

Die Population der CD90<sup>+</sup> Zellen konnte mit Hilfe des im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Kultursystems in 5 Wochen mit einem Faktor von über 2000 sehr stark expandiert werden.

Das Zelloberflächenmolekül CD90 wird auf unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert (Baum et al., 1992; Craig et al., 1993). Neuere Publikationen zeigen, dass CD90 auch auf aktivierten Endothelzellen nachweisbar ist und den Rezeptor für ein leukozytäres Antigen darstellt, der Leukozytenadhäsion und transendothiale Migration bewirkt. Ruhende Endothelzellen zeigten dagegen keine Expression von CD90 (Saalbach et al., 2002; Wetzel et al., 2004).

Damit könnte es sich bei den proliferierenden CD90<sup>+</sup> Zellen in unseren Expansionskulturen um hämatopoetische Stammzellen oder um endothiale Vorläuferzellen oder um beide Zelltypen handeln.

Neben den CD90<sup>+</sup> Zellen wurden auch die CD117<sup>+</sup> Zellen unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellkulturbedingungen vermehrt. Der relative Anteil der CD117<sup>+</sup> Zellen in den Expansionskulturen war jedoch deutlich geringer als der der CD90<sup>+</sup> Zellen.

Von anderen Gruppen konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD117 auf hämatopoetischen Stammzellen von ihrem Differenzierungspotenzial abhängt. Die unreifsten ruhenden Stammzellen, die NOD-SCID Mäuse repopulieren konnten, bildeten bei diesen Experimenten wenig oder kein c-kit. Die in Zellteilung

befindlichen reiferen Progenitoren exprimierten hingegen mehr c-kit (Kawashima et al., 1996). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass es sich bei den c-kit negativen Zellen in den ex-vivo Kulturen der vorliegenden Arbeit um unreife Stammzellen handeln könnte.

Zusammenfassend zeigten die immunphänotypischen Analysen, dass in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Expansionskulturen unreife hämatopoetische Stammzellen vorhanden waren.

Auch die parallel durchgeführten funktionellen Analysen des koloniebildenden Potenzials bestätigten diese Annahme. Nach 5 Wochen Kultivierung waren nämlich mehr multipotente CFU-GEMM bildende Stammzellen in den Kulturen vorhanden als am Isolationstag der Stammzellen. Das zeigt, dass diese unreifen Stammzellen unter den von uns entwickelten Kulturbedingungen proliferierten. Obwohl die relative koloniebildende Potenz der ex-vivo expandierten Stammzellen geringer war als die der frisch isolierten, ergab sich durch die starke Proliferation eine Zunahme der absoluten Progenitorzellzahlen.

Nach fünf Wochen unter dem Einfluss von SCGF, VEGF und FLT3L war die Zahl der unreifsten CFU-GEMM Kolonien um den Faktor 48, die Zahl der CFU-E Kolonien um den Faktor 60, die Zahl der CFU-GM Kolonien um den Faktor 59 und die Zahl der CFU-G Kolonien um den Faktor 100 höher. Die stärkste Expansion um den Faktor 1355 zeigten die Progenitoren mit monozytärer koloniebildender Potenz.

In der Literatur belegen Daten die Zunahme der koloniebildenden Potenz von Stammzellen, die unter dem Einfluss von TPO, SCF und FLT3L ex-vivo expandiert wurden. Lam et al. fanden, dass die Zahl der CFU-GEMM Kolonien ca. 10-fach, die der CFU-E Kolonien 50-fach und die der CFU-GM Kolonien ca. 200-fach amplifiziert werden konnte (Lam et al., 2001).

Diese Expansion war deutlich ausgeprägter als die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessene. Die von Lam et al. verwandte Zytokinkombination induzierte somit eine schnellere Proliferation der koloniebildenden Progenitoren. Es ist jedoch unklar, ob das koloniebildende Potenzial auch über einen längeren Kulturzeitraum vorhanden bleibt.

Es gibt in der zum gegenwärtigen Zeitpunkt vorliegenden Literatur keine Arbeit über das klonogene Potenzial von 5 Wochen unter dem Einfluss von SCGF, VEGF und FLT3L kultivierten CD133<sup>+</sup> Stammzellen.

Vor allem der Nachweis der Expansion der CFU-GEMM Kolonien bestätigten unsere Annahme, dass unreife, multipotente Progenitoren unter den von uns entwickelten Bedingungen proliferierten.

Um die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ex-vivo expandierten Stammzellen in-vivo zu analysieren, wurden sie in immuninkompetente NOD-SCID Mäuse transplantiert.

Dieses Tiermodell stellte das gegenwärtig beste Testsystem dar, um Multipotenz und Selbsterneuerungsfähigkeit menschlicher Stammzellen zu evaluieren.

Die Proliferation adulter, humaner hämatopoetischer Stammzellen konnte mit Kombinationen bestimmter Wachstumsfaktoren bis zum heutigen Zeitpunkt zwar erfolgreich induziert werden. Die proliferierenden Zellen zeigten jedoch eine Ausdifferenzierung, die mit dem Verlust der Stammzelleigenschaften einherging.

Diese differenzierten Zellen waren nicht mehr in der Lage, die Hämatopoese von bestrahlten Tieren zu rekonstituieren (Dorrell et al., 2000; Williams, 1993).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden myeloabladierte NOD-SCID Mäuse mit 7, 14, 21 und 32 Tage ex-vivo expandierten Stammzellen transplantiert. Nach 3 Monaten zeigte sich, dass in allen überlebenden Tieren menschliche Zellen nachweisbar waren. Da das Knochenmark der Mäuse erst 3 Monate nach der Transplantation untersucht wurde, muss davon ausgegangen werden, dass Zellen mit Stammzellcharakter im Transplantat vorhanden waren. Die ebenfalls übertragenen, kommitierten Progenitorzellen hätten sich zu diesem Zeitpunkt durch Ausdifferenzierung in reife Endzellen erschöpft und wären nicht mehr nachweisbar gewesen.

80% der Tiere mit den 7 Tage kultivierten Stammzellen zeigten vollständiges humanes Linienengraftment. Die 14 Tage expandierten Stammzellen differenzierten sich in den NOD-SCID Mäusen nicht in alle Blutzellreihen. 14% der mit 3 Wochen kultivierten menschlichen Zellen behandelten Mäuse zeigten vollständiges Linienengraftment. Bei Mäusen, die mit mehr als 4 Wochen kultivierten Zellen transplantiert wurden, zeigte sich auch ein erfolgreiches Anwachsen der humanen Zellen. Bei 75% der Tiere waren alle untersuchten

hämatopoetischen Linien im Knochenmark nachweisbar. Die beobachteten Unterschiede in der Etablierung der humanen Hämatopoese durch die unterschiedlich lange ex-vivo expandierten Stammzellen waren vermutlich Zufallsschwankungen. Für eine statistische Aussage reichte die Anzahl der transplantierten Tiere nicht aus.

Die genaue Frequenz der langzeitrepopulierenden Stammzellen in unseren ex-vivo Kulturen muss noch durch Transplantation serieller Verdünnungen kultivierter Zellen bestimmt werden.

Das wichtigste Ergebnis der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Bedingungen zur ex-vivo Expansion ist jedoch, dass Stammzellen mit SCGF, VEGF und FLT3L erfolgreich zur Proliferation angeregt werden konnten und nach über 4 Wochen in Zellkultur in der Lage waren, NOD-SCID Mäuse zu repopulieren.

Bei den Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation des Multilinienengraftments mit der relativen Expression der gleichzeitig immunphänotypisch untersuchten Stammzellmarker CD133, CD34, CD90, CD7 und CD117 gefunden werden. Alle Stammzellmarker wurden über den gesamten Verlauf der Kulturen von einem Teil der proliferierenden Zellen exprimiert. Deshalb kann keine Aussage darüber getroffen werden, welcher Zelloberflächenphänotyp für die gezeigte repopulierende Aktivität verantwortlich ist.

Kuci et al. zeigten in einer neueren Publikation, dass adhäsente CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> Zellen, die sich durch mehrwöchige ex-vivo Kultur mit FLT3L, IL-6 und SCF aus initial CD133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen differenziert hatten, repopulierende Aktivität besaßen. Die adhärenen CD133<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> Zellen proliferierten jedoch im Unterschied zu unseren nicht adhärenen, ex-vivo vermehrten Stammzellen nicht (Kuci et al., 2003).

Eine andere Gruppe konnte zeigen, dass mit der Kombination der Zytokine Thrombopoietin, SCF, IL-6 und FLT3L humane CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus Nabelschnurblut über einen Kulturzeitraum von bis zu 12 Wochen ex-vivo expandiert werden konnten. In diesem Kultursystem waren über vier Wochen kultivierte Zellen auch deutlich erfolgreicher in der Langzeitrepopulierung von NOD-SCID Mäusen als nicht ex-vivo expandierte Zellen (Piacibello et al., 1999). In der oben erwähnten Studie wurden deutlich geringere Zellzahlen in der

Größenordnung von  $10^4$  Zellen transplantiert als in der vorliegenden Arbeit. Die ex-vivo expandierten Zellen wurden aber mit mindestens  $10^6$  nichtteilungskompetenten bestrahlten CD34<sup>+</sup> Zellen koinjiziert. Außerdem sind die im fötalen Nabelschnurblut enthaltenen Stammzellen unreifer als die im Rahmen der vorliegenden Arbeit kultivierten adulten CD133<sup>+</sup> Stammzellen, so dass man diese Zellpopulationen nicht direkt vergleichen kann.

Shih et al. zeigten, dass fötale humane, langzeitrepopulationskompetente Knochenmarkzellen, die auf Maus-Stromazellen kultiviert wurden, mit Hilfe von LIF, SCF, IL-3, IL-6 und GM-CSF in fünf Wochen 150-fach ex-vivo expandiert werden konnten (Shih et al., 1999).

Es gibt in der gegenwärtig vorliegenden Literatur keine Arbeit, welche die erfolgreiche ex-vivo Expansion von humanen, repopulationskompetenten, adulten Stammzellen über einen Zeitraum von über 4 Wochen beschreibt. Daraus folgt, dass das im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebene ex-vivo Kultursystem mit SCGF, VEGF und FLT3L es erstmalig ermöglicht, Stammzellen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und möglicherweise sogar zu expandieren, ohne dass sie ausdifferenzieren und ihr Stammzellpotenzial verlieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zusätzlich zu den Stammzelleigenschaften analysiert werden, ob die proliferierenden Zellen Endothelprogenitorzellen enthielten und damit möglicherweise als ausreichend große Ursprungspopulation für Endothelzellen dienen könnten.

Dazu wurden die proliferierenden Stammzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf die Expression der endothelialen Zelloberflächenmoleküle vWF, CD105, VE-Cadherin (CD144), CD14 und CD31 untersucht.

CD105 und CD14 werden von Monozyten und Endothelzellen koexprimiert, CD31 von Endothelzellen und hämatopoetischen Zellen. VWF ist ein gemeinsames Zelloberflächenmolekül von Megakaryozyten und Endothelzellen. VE-Cadherin ist bis heute das einzige endothelspezifische Zelloberflächenmolekül (Rafii und Lyden, 2003; Schmeisser und Strasser, 2002).

Die Zelloberflächenmarker vWF, CD144, CD31, KDR und der Rezeptor für Ulex wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit außerdem mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen untersucht.

KDR wird von Endothelzellen, hämatopoetischen Zellen und Hämangioblasten exprimiert. Der Rezeptor für das *Ulex europaeus* Lektin wird von hämatopoetischen Zellen und von Endothelzellen koexprimiert (Rafii und Lyden, 2003).

Um die funktionelle Endothelprogenitorkapazität der proliferierenden Zellen zu untersuchen, wurden endotheliale Colony-Assays durchgeführt.

Bei diesen Analysen ergab sich für das einzige endothelspezifische Molekül CD144 nach der Isolation der Stammzellen und bis Kulturtag 6 eine niedrige Expressionsrate von <1%. Im weiteren Verlauf der Expansionsphase stieg der Anteil der VE-Cadherin<sup>+</sup> Zellen auf Werte zwischen 1% und 3,4% an. Bedingt durch die starke Zellproliferation konnten die VE-Cadherin positiven Zellen um den Faktor von fast 15000 expandiert werden. Da VE-Cadherin sowohl von reifen Endothelzellen als auch von Endothelvorläuferzellen exprimiert wird, lässt sich vermuten, dass beide Zellpopulationen unter den von uns entwickelten Kulturbedingungen erfolgreich vermehrt werden konnten (Rafii und Lyden, 2003).

Die durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen ergaben jedoch bis zum 14. Expansionstag keinen Nachweis von VE-Cadherin. Diese Diskrepanz mit den FACS Untersuchungen könnte auf unterschiedliche Sensitivitäten der Durchflusszytometrie und der Immunfluoreszenz zurückzuführen sein.

Die Expression von vWF zeigte in den Expansionskulturen einen ähnlichen Verlauf mit etwas höheren relativen Anteilen der positiven Zellen von 1,2%-6%. Die Zahl der vWF<sup>+</sup> Zellen stieg um den Faktor 11000 an. Die mittels FACS und Immunfluoreszenzanalysen gemessene vWF-Expression korrelierte mit einem Prozentsatz von 5% nach 14 Expansionstagen gut mit dem Anteil der VE-Cadherin<sup>+</sup> Zellen und legt nahe, dass dadurch endotheliale Zellen erfasst wurden.

Die Expression des Rezeptors für *Ulex europaeus* war immunzytochemisch bis Tag 14 nicht nachweisbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass während der ex-vivo Expansion der Stammzellen CD144<sup>+</sup>, vWF<sup>+</sup> und CD31<sup>+</sup> Endothelprogenitorzellen proliferierten.

Die Differenzierung zwischen hämatopoetischen und Endothel- bzw. Endothelvorläuferzellen wird jedoch durch starke phänotypische Überschneidungen zwischen diesen Zellpopulationen erschwert (Rafii und Lyden, 2003; Schmeisser und Strasser, 2002).

Neuere Arbeiten zeigen eine sehr enge Verwandtschaft zwischen endothelialen und monozytären Zellen. Verschiedene Zelloberflächenmarker wie CD14 und CD105 kommen auf beiden Zelltypen vor. So wurde kürzlich nachgewiesen, dass der als monozytenspezifisch geltenden Marker CD14 auch auf HUVEC-Zellen gefunden werden konnte (Jersmann et al., 2001).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass aus dem peripheren Blut isolierte CD14<sup>+</sup> Zellen, die die endothelialen Antigene vWF, VE-Cadherin oder Tie-2 nicht exprimierten, sich unter dem Einfluss von VEGF in-vitro in Endothelzellen transdifferenzierten (Fernandez Pujol et al., 2000). Diese Zellen zeigten eine gemeinsame Expression von monozytären und endothelialen Markern. So konnten CD14<sup>+</sup> Monozyten, die initial keine Endothelmarker exprimierten, erfolgreich zur Reendothelialisierung von durch Ballondilatation verletzten Gefäßwänden von Ratten eingesetzt werden (Fujiyama et al., 2003).

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die ex-vivo expandierten Vorläuferzellen sich morphologisch und immunphänotypisch in reife Endothelzellen differenzieren konnten.

Hierzu wurden 14 Tage expandierte Zellen nur noch unter dem Einfluss von VEGF über 14 Tage weiterkultiviert. Diese Kulturbedingungen induzierten dramatische morphologische Veränderungen. Die Zellen wurden innerhalb weniger Tage adhärent, flachten sich ab und bekamen eine endothiale Morphologie. Ein Teil der Zellen blieb allerdings klein, rund und nicht-adhärent. Außerdem stellten alle Zellen die Proliferation ein. Die unter diesen Kulturbedingungen entstandenen Zellen wurden immunzytochemisch auf die Antigene VWF, CD144, CD31, KDR und den Rezeptor für Ulex untersucht.

Die relative Expression der Endothelmarker VE-Cadherin, Ulex-Rezeptor und vWF stieg auf 100% an. Die CD31-Expression blieb konstant hoch. Die Expression des hämatopoetischen, endothelialen und Hämangioblastenmarkers KDR stieg von 11,3% auf 78% an.

Diese Veränderungen zeigten, dass sich alle ex-vivo expandierten Zellen in adhärente Endothelzellen und nicht-adhärente Endothelvorläuferzellen differenzierten. Damit wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ex-vivo Expansionsbedingungen entwickelt, um Endothelvorläuferzellen in großer Zahl herzustellen, die sich in einem zweiten Schritt in reife Endothelzellen differen-

zieren ließen (26-fache Expansion der Progenitoren nach 14 Tagen, 940-fache Expansion der Progenitoren nach 28 Tagen).

Quirici et al. kultivierten isolierte CD133<sup>+</sup> Zellen mit VEGF, bFGF und IGF. Nach 28 Tagen zeigte sich eine Zellzahlzunahme um den Faktor 2000. Die Zellen besaßen eine endotheliale Morphologie und exprimierten die endothelialen Antigene vWF und Ulex-Rezeptor zu 50 bzw. 70%. Ca. 20% der Zellen exprimierten CD14. Damit wurde von dieser Gruppe eine vergleichbare Expansion von Endothelprogenitorzellen bei einer wie in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Koexpression von endothelialen und monozytären Markern gezeigt (Quirici et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe von Kalka et al. expandierte Endothelprogenitorzellen aus dem peripheren Blut unter dem Einfluss von VEGF, EGF, IGF und FGF 90-fach innerhalb von 10 Tagen. Sie zeigten, dass diese Zellen erfolgreich die Revascularisierung von ischämischen Mausbeinen fördern konnten. Die Ursprungszellpopulation bei diesen Experimenten bestand aus den auf Fibronectin adhärent werdenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Über 70% der Zellen exprimierten nach der ex-vivo Expansion die endothelialen Marker VE-Cadherin, KDR und CD31. Über 90% der Zellen trugen CD14 auf ihrer Oberfläche (Kalka et al., 2000).

Der von Kalka et al. ermittelte Immunphänotyp bestätigt die Daten der vorliegenden Arbeit, in der ebenfalls eine Koexpression von hämatopoetischen und monozytären Molekülen gefunden wurde. Die von uns erzeugten adharenten und nicht adharenten Endothelzellen exprimierten das spezifische Zelladhäsionsmolekül VE-Cadherin zu 100%, was im Vergleich zu den oben zitierten Untersuchungen für eine höhere Reinheit dieser Zellen spricht. Unsere Endothelzellen proliferierten jedoch nicht ex-vivo unter dem Einfluss von VEGF. Deshalb sollen in Zukunft Zellkulturbedingungen entwickelt werden, die eine Vermehrung der adharenten Endothelzellen induzieren können.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit die erfolgreiche ex-vivo Expansion einer Zellpopulation, die einerseits Stammzellmarker und andererseits Endothel- bzw. Monozytenmarker exprimierte, etabliert wurde. Die expandierten Zellen bildeten multipotente hämatopoetische und endotheliale Kolonien und konnten bis zu 4,5 Wochen in Kultur NOD-SCID Mäuse

repopulieren. Außerdem konnten sie sich in morphologisch und immunphänotypisch charakterisierte Endothelzellen differenzieren.

Deshalb wurde im letzten Teil der vorliegenden Arbeit auf Einzelzellebene untersucht, ob die expandierte Zellpopulation Hämangioblasten enthielt.

Von unserer und anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass CD133<sup>+</sup> Zellen sich in die hämatopoetische und endotheliale Richtung differenzieren konnten (de Wynter et al., 1995; Gehling et al., 2000; Miraglia et al., 1997; Peichev et al., 2000; Yin et al., 1997).

In den zugrunde liegenden Arbeiten konnte aber nicht unterschieden werden, ob in der CD133<sup>+</sup> Population unterschiedliche Stammzellen für die hämatopoetische und endotheliale Zellreihe vorhanden waren oder ob eine gemeinsame Stammzelle Nachkommen für beide Differenzierungsrichtungen generieren konnte.

Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, sollten die CD133<sup>+</sup> Zellen stabil mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden.

Dazu wurden die proliferierenden Stammzellen retroviral mit dem durchflusszytometrisch und immunzytochemisch nachweisbaren Markergen GFP transduziert. Auf diese Weise war es mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen und durch Kernfärbungen mit roten und blauen Fluoreszenzfarbstoffen möglich, das Differenzierungspotenzial der Nachkommen einer grün fluoreszierenden Ursprungszelle in die endotheliale und hämatopoetische Richtung zu analysieren. Retrovirale Vektoren integrieren sich in das Genom ihrer Zielzellen, was zu einer stabilen Expression des gewünschten Transgens führt. Diese Eigenschaften machen diese Vektoren zu einem idealen Werkzeug für die Transduktion verschiedener Zellen mit gentherapeutischen und grundlagenwissenschaftlichen Fragestellungen. Der Retrovirus-vermittelte Gentransfer in multipotente Stammzellen wurde lange Zeit durch zu geringe Gentransfereffizienzen limitiert (Dunbar et al., 1995). In neueren Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die retrovirale Transduktion durch Zentrifugation der Vektorpartikel auf die zu transduzierenden Zellen oder auf die extrazelluläre Matrixkomponente Fibronectin zu einer höheren Gentransfereffizienz führte (Abonour et al., 2000; Hanenberg et al., 1996). So konnte im Rahmen einer klinischen Studie eine mittlere

Gentransfereffizienz von 14% in humane CD34<sup>+</sup> Zellen erreicht werden (Abonour et al., 2000).

Mit Hilfe dieser Technik konnten außerdem humane T-Zellen bis zu einem Anteil von 85% und mesenchymale Stammzellen bis zu einem Anteil von 90% mit dem auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzten S11αEGFP Vektor transduziert werden. Die retrovirale Transduktion von CD133<sup>+</sup> Stammzellen mit S11αEGFP wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert (Kuhlcke et al., 2002).

Dabei wurden Experimente mit je zwei oder fünf Transduktionszyklen durchgeführt. Es wurde eine mittlere Gentransfereffizienz von 19 bzw. 59% erreicht. Dadurch ließ sich eine Abhängigkeit der Gentransfereffizienz von der Anzahl der Infektionszyklen zeigen. Diese Abhängigkeit wurde für den Vektor S11αEGFP bereits von Wahlers et al. publiziert, deren Daten damit reproduziert werden konnten (Wahlers et al., 2001).

Die retrovirale Transduktion führte zu keiner Änderung der Zellmorphologie der ex-vivo expandierten Zellen.

Um die Vitalität der transduzierten Zellen zu gewährleisten wurden nur zweimal transduzierte Zellen für die Experimente verwendet. Diese markierten Zellen wurden mittels FACS-Sorting oder Limiting Dilution als Einzelzellen ausgesät. Anschließend wurde ein Überschuss an nicht-transduzierten Fütterzellen zugesetzt.

Bei diesen Experimenten stellte sich heraus, dass im Gegensatz zur Limiting Dilution die durchfluszytometrisch sortierten Zellen nicht proliferierten. Deshalb wurden die GFP-markierten Zellen für die weiteren Untersuchungen per Limiting Dilution gewonnen.

Nur ca. 7% der vereinzelten Stammzellen teilten sich innerhalb von 24 Tagen mindestens fünfmal und erreichten so die für die weitere Analysierbarkeit festgelegte Grenze von 30 GFP-markierten Zellen. Diese markierten Klone wurden danach auf zwei Zellkulturgefäße aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit G-CSF zur Induktion der hämatopoetischen Differenzierung und die andere Hälfte mit VEGF zur Induktion der endothelialen Differenzierung inkubiert. Anschließend wurden die unter den hämatopoetischen Kulturbedingungen entstandenen markierten Zellen anhand ihrer Kernmorphologie und der Expression von CD13

als Granulozyten identifiziert. Parallel dazu erfolgte die Untersuchung der Zellen aus den endothelialen Kulturen auf gleichzeitige GFP-, VE-Cadherin- und Ulex-Rezeptor-Expression.

So konnte gezeigt werden, dass 1,8% der Einzelzellen sowohl eine ausreichende Proliferationskapazität besaßen als auch in der Lage waren, hämatopoetische und endotheliale Zellen zu generieren. Damit konnte definitiv bewiesen werden, dass 1,8% der expandierten CD133<sup>+</sup> Zellen Hämangioblasten waren.

Neuere Publikationen zeigen, dass hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark sich an der Blutgefäßneubildung in Tumoren beteiligen (Lyden et al., 2001). Unsere Gruppe und andere ermittelten die CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup> Zellen als für dieses Phänomen verantwortliche Zellpopulation (Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000). Basierend auf diesen Ergebnissen stellten wir die Hypothese auf, dass KDR ein Marker des humanen postnatalen Hämangioblasten sein könnte, wie es für die murine Embryonalentwicklung bereits von Choi et al. gezeigt wurde (Choi et al., 1998).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bei der immunphänotypischen Analyse der proliferierenden Stammzellen gezeigt werden, dass die Population der KDR<sup>+</sup> Zellen unter den etablierten Expansionsbedingungen zunahm und zum Induktionszeitpunkt der endothelialen und hämatopoetischen Differenzierung ca. 6-15% der Zellen CD133<sup>+</sup> waren. Außerdem waren die ex-vivo expandierten Stammzellen positiv für die von embryonalen Hämangioblasten exprimierten Transkriptionsfaktoren SCL und GATA-2.

Basierend auf diesen Daten vermuten wir, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Zellen mit der hämangioblastischen Potenz den CD133<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>SCL<sup>+</sup> GATA-2<sup>+</sup> Phänotyp besaßen.

Bailey et al. wiesen in einer neueren Arbeit auf Einzelzellebene murine, adulte Hämangioblasten in der Population der c-kit<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> Zellen nach. Diese Zellen besaßen auch multipotente, hämatopoetische Stammzelleigenschaften (Bailey et al., 2004). In der im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Hämangioblasten untersuchten expandierten Population der CD133<sup>+</sup> Zellen waren zum Analysezeitpunkt ca. 2-8% der Zellen positiv für c-kit, so dass auch dieser Zelloberflächenmarker zum beobachteten bipotenten Phänotyp beitragen könnte.

Zum Untersuchungszeitpunkt war auf ca. 50% der Zellen das Zelloberflächenmolekül CD105 nachweisbar. Andere Gruppen konnten bereits zeigen, dass CD105 auf hämatopoetischen Stammzellen, aktivierten Monozyten und endothelialen Zellen koexprimiert wird (Mancuso et al., 2001; Pierelli et al., 2000). In einer neueren Arbeit wurde ermittelt, dass CD105 während der Differenzierung von mesodermalen Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen mit KDR koexprimiert wird (Cho et al., 2001). Cho et al. beschrieben in dieser Publikation, dass die Expression von CD105 die hämatopoetische Differenzierung der KDR<sup>+</sup> Zellen anzeigen. Die Autoren stellten jedoch außerdem die Hypothese auf, dass die KDR<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup> Zellen auch Hämangioblasten enthielten. Pierelli et al. konnten bereits zeigen, dass in CD34<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup> Zellen primitive, multipotente hämatopoetische Stammzellen angereichert waren (Pierelli et al., 2000).

Hinweise auf eine wichtige Rolle von CD105 für die Blutgefäßbildung konnten auch durch Studien mit Knock-out Mäusen, die durch fehlende Reifung des ersten primitiven Kapillarplexus und Herzfehler in-utero starben, gewonnen werden (Li et al., 1999). Es ist bis heute aber nicht bekannt, ob CD105<sup>+</sup> Zellen Stammzellen mit hämangioblastischer Potenz enthalten.

Andere Gruppen zeigten, dass auch CD90 von hämatopoetischen Stammzellen und von Endothelzellen exprimiert wird (Danilov et al., 2001; Wetzel et al., 2004). 17-27% der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen waren positiv für CD90. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Kulturbedingungen optimal für die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen waren, was auch durch die NOD-SCID Daten und Colony-Assays bestätigt wurde. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, dass die Proliferation von CD90<sup>+</sup> endothelialen Progenitoren oder von Hämangioblasten angeregt wurde. Es ist auch möglich, dass Hämangioblasten sowie endothiale und hämatopoetische Vorläuferzellen unter den Expansionsbedingungen der vorliegenden Arbeit nebeneinander vorhanden waren.

Während unserer Analyse der vierzehntägigen Expansionsphase stieg die Zahl der CD14<sup>+</sup> Zellen am stärksten. Ihr Anteil betrug zu diesem Zeitpunkt 35-50%. Die CD14<sup>+</sup> Zellen entsprachen wahrscheinlich weitgehend Monozyten oder deren Vorläuferzellen. Dies ist mit den anderen funktionellen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbar, denn die Anzahl der monozytären-koloniebildenden

Zellen stieg von allen koloniebildenden Zelltypen während der ex-vivo Expansion am meisten.

Neuere Arbeiten belegen außerdem, dass CD14 nicht nur von Monozyten, sondern auch von Endothelzellen exprimiert wird (Jersmann et al., 2001). Deshalb ist es möglich, dass ein Teil der in unseren Expansionskulturen beobachteten CD14<sup>+</sup> Zellen auch Endothelzellen entsprach. In den letzten Jahren wurde außerdem die Möglichkeit diskutiert, dass sich Monozyten in Endothelzellen transdifferenzieren könnten (Fernandez Pujol et al., 2000). Insofern wäre es möglich, dass der Übergang zwischen diesen beiden Zelltypen fließend ist.

In den letzten Jahren wurde über die Möglichkeit berichtet, aus Knochenmarkzellen andere Gewebetypen wie Hepatozyten, Herzmuskelzellen oder Nervenzellen zu differenzieren. In der jüngsten Literatur wird dieses Phänomen zunehmend kritisch gesehen.

So konnte gezeigt werden, dass für beschriebene Differenzierungen von Stammzellen in andere Gewebe, wie zum Beispiel in Hepatozyten, nicht Plastizität, sondern Zellfusion verantwortlich war (Lemischka, 2002a; Lemischka, 2002b; Wang et al., 2003; Ying et al., 2002). Diese Ergebnisse führten zu der Formulierung neuer Kriterien bei der Erfassung von Differenzierungsphänomenen, wie der Forderung nach genetischer Markierung durch retrovirale Insertionssequenzen und dem Nachweis dieser Sequenzen in den putativen Nachkommen und den Ursprungszellen (Goodell, 2003).

Deshalb muss auch die vorliegende Arbeit kritisch beleuchtet werden. Bei den durchgeführten Experimenten zum Nachweis des postnatalen Hämangioblasten auf Einzelzellebene waren Zellfusionen nicht auszuschließen. Auch kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass in den Einzelzellkulturen nicht doch zwei Ursprungszellen vorhanden waren, obwohl dies durch die durchgeführte intensive Inspektion jeder Vertiefung der Mikrotiterplatten sehr unwahrscheinlich ist.

Deshalb müssten retrovirale Insertionssequenzen in den aus einer GFP-positiven Zelle expandierten Ursprungszellen sowie in den anschließend differenzierten hämatopoetischen und endothelialen Zellen sequenziert werden, um die Klonalität eindeutig nachzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Zellkultursystem entwickelt wurde, mit dem das Entwicklungspotenzial von CD133<sup>+</sup> Stammzellen auf Einzelzellebene untersucht werden kann. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Population Hämangioblasten enthält und dass die CD133<sup>+</sup> Zellen effizient retroviral transduziert werden können. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die transduzierten Zellen ihre hämangioblastische Potenz über einen Kulturzeitraum von 28 Tagen behalten. Dieses Kultursystem könnte es ermöglichen, den Phänotyp der Hämangioblasten in Zukunft genauer zu definieren.

### **6.1 AUSBLICK**

In zukünftigen Experimenten soll durch Transplantation von NOD-SCID Mäusen mit durchflusszytometrisch sortierten Zellen, die fast ausschließlich definierte Zelloberflächenmoleküle exprimieren, der Phänotyp der repopulierenden Zellen analysiert werden. Mit Hilfe von seriellen Verdünnungen soll dann die Frequenz der repopulierenden Zellen in den verschiedenen, sortierten Zellpopulationen bestimmt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die ex-vivo expandierten Zellen sich in-vitro in adhärente und nicht-adhärente Endothelzellen differenzieren konnten. Diese Endothelzellen proliferierten jedoch nur wenig.

Für potenzielle klinische Anwendungen wäre jedoch eine starke Vermehrung der Endothelzellen wünschenswert, um künstliche, thrombogene Oberflächen vor der Implantation mit Endothelzellen in Form eines Monolayers zu bewachsen. Deshalb soll in Zukunft versucht werden, die Proliferation der adhärenten, differenzierten Endothelzellen mit Hilfe zusätzlicher Zytokine wie z.B. EGF, HGF, IGF oder IL-8 zu induzieren.

Außerdem soll untersucht werden, ob die nicht-adhärenten Endothelzellen durch die oben genannten Zytokine oder die Verwendung einer anderen Matrix adhärent werden können. Vor einer Anwendung am Menschen müssen die erzeugten Endothelzellen noch in-vivo in Mausgefäßen auf ihre Funktionalität getestet werden.

Schließlich soll die Differenzierungskapazität der expandierten Zellen in Zellen anderer Gewebetypen wie z.B. Osteoblasten oder Chondroblasten untersucht werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abonour, R., Williams, D. A., Einhorn, L., Hall, K. M., Chen, J., Coffman, J., Traycoff, C. M., Bank, A., Kato, I., Ward, M., *et al.* (2000). Efficient retrovirus-mediated transfer of the multidrug resistance 1 gene into autologous human long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Nat Med* 6, 652-658.
- Adolfsson, J., Borge, O. J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S. E. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15, 659-669.
- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., *et al.* (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296, 2410-2413.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J. M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
- Ashman, L. K., Cambareri, A. C., To, L. B., Levinsky, R. J., and Juttner, C. A. (1991). Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 78, 30-37.
- Ayuk, F., Li, Z., Kuhlcke, K., Lindemann, C., Schade, U., Eckert, H. G., Zander, A., and Fehse, B. (1999). Establishment of an optimised gene transfer protocol for human primary T lymphocytes according to clinical requirements. *Gene Ther* 6, 1788-1792.
- Bailey, A. S., Jiang, S., Afentoulis, M., Baumann, C. I., Schroeder, D. A., Olson, S. B., Wong, M. H., and Fleming, W. H. (2004). Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 103, 13-19.
- Baldacci, E., Azzarello, G., Valenti, M. T., Capuzzo, G. M., Pappagallo, G. L., Pilotti, I., Ausoni, S., Bari, M., Rosetti, F., Sartori, D., *et al.* (2003). The impact of progenitor enrichment, serum, and cytokines on the ex vivo expansion of mobilized peripheral blood stem cells: a controlled trial. *Stem Cells* 21, 33-40.
- Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D. A., and von Kalle, C. (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101, 2099-2114. Epub 2003 Jan 2003.

- Baum, C., von Kalle, C., Staal, F. J., Li, Z., Fehse, B., Schmidt, M., Weerkamp, F., Karlsson, S., Wagemaker, G., and Williams, D. A. (2004). Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther* 9, 5-13.
- Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M., and Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2804-2808.
- Becker, A. J., Mc, C. E., and Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.
- Begley, C. G., Aplan, P. D., Denning, S. M., Haynes, B. F., Waldmann, T. A., and Kirsch, I. R. (1989). The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10128-10132.
- Berenson, R. J., Bensinger, W. I., Hill, R. S., Andrews, R. G., Garcia-Lopez, J., Kalamasz, D. F., Still, B. J., Spitzer, G., Buckner, C. D., Bernstein, I. D., and et al. (1991). Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patients with breast cancer or neuroblastoma. *Blood* 77, 1717-1722.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I., and Dick, J. E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 4, 1038-1045.
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., and Vescovi, A. L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I., and Blau, H. M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-1779.
- Broudy, V. C. (1997). Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 90, 1345-1364.
- Broudy, V. C., Lin, N., Zsebo, K. M., Birkett, N. C., Smith, K. A., Bernstein, I. D., and Papayannopoulou, T. (1992). Isolation and characterization of a monoclonal antibody that recognizes the human c-kit receptor. *Blood* 79, 338-346.
- Brown, J., Greaves, M. F., and Molgaard, H. V. (1991). The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol* 3, 175-184.
- Broxmeyer, H. E., Srour, E. F., Hangoc, G., Cooper, S., Anderson, S. A., and Bodine, D. M. (2003). High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 645-650.
- Brugger, W., Heimfeld, S., Berenson, R. J., Mertelsmann, R., and Kanz, L. (1995). Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Engl J Med* 333, 283-287.

- Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A., and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, 64-66.
- Cho, S. K., Bourdeau, A., Letarte, M., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2001). Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. *Blood* 98, 3635-3642.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725-732.
- Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14541-14546.
- Chung, Y. S., Zhang, W. J., Arentson, E., Kingsley, P. D., Palis, J., and Choi, K. (2002). Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* 129, 5511-5520.
- Civin, C. I., Banquerigo, M. L., Strauss, L. C., and Loken, M. R. (1987). Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol* 15, 10-17.
- Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., and Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-1663.
- Craig, W., Kay, R., Cutler, R. L., and Lansdorp, P. M. (1993). Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 177, 1331-1342.
- Damert, A., Miquerol, L., Gertsenstein, M., Risau, W., and Nagy, A. (2002). Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development* 129, 1881-1892.
- Danilov, S. M., Gavrilyuk, V. D., Franke, F. E., Pauls, K., Harshaw, D. W., McDonald, T. D., Miletich, D. J., and Muzykantov, V. R. (2001). Lung uptake of antibodies to endothelial antigens: key determinants of vascular immunotargeting. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L1335-1347.
- Davidoff, A. M., Ng, C. Y., Brown, P., Leary, M. A., Spurbeck, W. W., Zhou, J., Horwitz, E., Vanin, E. F., and Nienhuis, A. W. (2001). Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res* 7, 2870-2879.
- de Bruijn, M. F., Ma, X., Robin, C., Ottersbach, K., Sanchez, M. J., and Dzierzak, E. (2002). Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta. *Immunity* 16, 673-683.
- de Wynter, E. A., Buck, D., Hart, C., Heywood, R., Coutinho, L. H., Clayton, A., Rafferty, J. A., Burt, D., Guenechea, G., Bueren, J. A., et al. (1998). CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16, 387-396.

- de Wynter, E. A., Coutinho, L. H., Pei, X., Marsh, J. C., Hows, J., Luft, T., and Testa, N. G. (1995). Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells* 13, 524-532.
- Dick, J. E., Guenechea, G., Gan, O. I., and Dorrell, C. (2001). In vivo dynamics of human stem cell repopulation in NOD/SCID mice. *Ann N Y Acad Sci* 938, 184-190.
- Donovan, P. J., and Gearhart, J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414, 92-97.
- Dorrell, C., Gan, O. I., Pereira, D. S., Hawley, R. G., and Dick, J. E. (2000). Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood* 95, 102-110.
- Dunbar, C. E., Cottler-Fox, M., O'Shaughnessy, J. A., Doren, S., Carter, C., Berenson, R., Brown, S., Moen, R. C., Greenblatt, J., Stewart, F. M., and et al. (1995). Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. *Blood* 85, 3048-3057.
- Eaves, C., Miller, C., Cashman, J., Conneally, E., Petzer, A., Zandstra, P., and Eaves, A. (1997). Hematopoietic stem cells: inferences from in vivo assays. *Stem Cells* 15 Suppl 1, 1-5.
- Elefanti, A. G., Begley, C. G., Hartley, L., Papaevangelou, B., and Robb, L. (1999). SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 94, 3754-3763.
- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W. J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W. L., Orkin, S., Choi, K., and Rossant, J. (2003). Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* 17, 380-393.
- Fernandez Pujol, B., Lucibello, F. C., Gehling, U. M., Lindemann, K., Weidner, N., Zuzarte, M. L., Adamkiewicz, J., Elsasser, H. P., Muller, R., and Havemann, K. (2000). Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 65, 287-300.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.
- Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., and Greaves, M. F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426.

- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31.
- Folkman, J., and Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931-10934.
- Fujiyama, S., Amano, K., Uehira, K., Yoshida, M., Nishiwaki, Y., Nozawa, Y., Jin, D., Takai, S., Miyazaki, M., Egashira, K., et al. (2003). Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 93, 980-989.
- Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D. M., Karanu, F. N., Keeney, M., and Bhatia, M. (2000). Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 95, 2813-2820.
- Gehling, U. M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., et al. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-3112.
- Gerber, H. P., Malik, A. K., Solar, G. P., Sherman, D., Liang, X. H., Meng, G., Hong, K., Marsters, J. C., and Ferrara, N. (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417, 954-958.
- Gering, M., Rodaway, A. R., Gottgens, B., Patient, R. K., and Green, A. R. (1998). The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *Embo J* 17, 4029-4045.
- Godin, I., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1995). Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 773-777.
- Goodell, M. A. (1999). Introduction: Focus on hematology. CD34(+) or CD34(-): does it really matter? *Blood* 94, 2545-2547.
- Goodell, M. A. (2003). Stem-cell "plasticity": befuddled by the muddle. *Curr Opin Hematol* 10, 208-213.
- Goodell, M. A., Jackson, K. A., Majka, S. M., Mi, T., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., and Hirschi, K. K. (2001). Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 938, 208-218; discussion 218-220.
- Gordon, P. R., Leimig, T., Babarin-Dorner, A., Houston, J., Holladay, M., Mueller, I., Geiger, T., and Handgretinger, R. (2003). Large-scale isolation of CD133+ progenitor cells from G-CSF mobilized peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant* 31, 17-22.
- Gottgens, B., Nastos, A., Kinston, S., Piltz, S., Delabesse, E. C., Stanley, M., Sanchez, M. J., Ciau-Uitz, A., Patient, R., and Green, A. R. (2002). Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *Embo J* 21, 3039-3050.

- Grant, M. B., May, W. S., Caballero, S., Brown, G. A., Guthrie, S. M., Mames, R. N., Byrne, B. J., Vaught, T., Spoerri, P. E., Peck, A. B., and Scott, E. W. (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8, 607-612.
- Gratwohl, A., Baldomero, H., Horisberger, B., Schmid, C., Passweg, J., and Urbano-Ispizua, A. (2002). Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 100, 2374-2386.
- Gunsilius, E., Duba, H. C., Petzer, A. L., Kahler, C. M., Grunewald, K., Stockhammer, G., Gabl, C., Dirnhofer, S., Clausen, J., and Gastl, G. (2000). Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 355, 1688-1691.
- Haar, J. L., and Ackerman, G. A. (1971). A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat Rec* 170, 199-223.
- Hanenberg, H., Xiao, X. L., Diloo, D., Hashino, K., Kato, I., and Williams, D. A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 2, 876-882.
- Hao, Q. L., Zhu, J., Price, M. A., Payne, K. J., Barsky, L. W., and Crooks, G. M. (2001). Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood* 97, 3683-3690.
- Herzenberg, L. A., and De Rosa, S. C. (2000). Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today* 21, 383-390.
- Hiraoka, A., Sugimura, A., Seki, T., Nagasawa, T., Ohta, N., Shimonishi, M., Hagiya, M., and Shimizu, S. (1997). Cloning, expression, and characterization of a cDNA encoding a novel human growth factor for primitive hematopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7577-7582.
- Hudson, G. (1965). Organ Size of Human Foetal Bone Marrow. *Nature* 205, 96-97.
- Jackson, K. A., Mi, T., and Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14482-14486.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A., and Dieterlen-Lievre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 125, 4575-4583.
- Jersmann, H. P., Hii, C. S., Hodge, G. L., and Ferrante, A. (2001). Synthesis and surface expression of CD14 by human endothelial cells. *Infect Immun* 69, 479-485.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

- Jones, R. O. (1970). Ultrastructural analysis of hepatic haematopoiesis in the foetal mouse. *J Anat* 107, 301-314.
- Kabrun, N., Buhring, H. J., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W., and Keller, G. (1997). Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 124, 2039-2048.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W. M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J. M., and Asahara, T. (2000). Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3422-3427.
- Kamel-Reid, S., and Dick, J. E. (1988). Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242, 1706-1709.
- Kappel, A., Schlaeger, T. M., Flamme, I., Orkin, S. H., Risau, W., and Breier, G. (2000). Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* 96, 3078-3085.
- Kaufman, D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R., and Thomson, J. A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10716-10721. Epub 12001 Sep 10714.
- Kawashima, I., Zanjani, E. D., Almada-Porada, G., Flake, A. W., Zeng, H., and Ogawa, M. (1996). CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood* 87, 4136-4142.
- Keller, J. R., Ortiz, M., and Ruscetti, F. W. (1995). Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. *Blood* 86, 1757-1764.
- Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N., and Keller, G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488-493.
- Kishimoto, T., Kikutani, H., von dem Borne, E., Goyert, S., Mason, D., Miyasaka, M., Moretta, L., Okumura, K., Shaw, S., Springer, T., et al. (1998). Leukocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. (New York, Garland Publishing, Inc.).
- Kocher, A. A., Schuster, M. D., Szabolcs, M. J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N. M., and Itescu, S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, 430-436.
- Korbling, M., and Anderlini, P. (2001). Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 98, 2900-2908.
- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., and May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.

- Kuci, S., Wessels, J. T., Buhring, H. J., Schilbach, K., Schumm, M., Seitz, G., Loffler, J., Bader, P., Schlegel, P. G., Niethammer, D., and Handgretinger, R. (2003). Identification of a novel class of human adherent CD34+ stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood* 101, 869-876. Epub 2002 Sep 2019.
- Kuhlcke, K., Fehse, B., Schilz, A., Loges, S., Lindemann, C., Ayuk, F., Lehmann, F., Stute, N., Fauser, A. A., Zander, A. R., and Eckert, H. G. (2002). Highly efficient retroviral gene transfer based on centrifugation-mediated vector preloading of tissue culture vessels. *Mol Ther* 5, 473-478.
- Lam, A. C., Li, K., Zhang, X. B., Li, C. K., Fok, T. F., Chang, A. M., James, A. E., Tsang, K. S., and Yuen, P. M. (2001). Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion* 41, 1567-1576.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., et al. (1996). Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2, 1329-1337.
- Larrivee, B., Lane, D. R., Pollet, I., Olive, P. L., Humphries, R. K., and Karsan, A. (2003). Vascular endothelial growth factor receptor-2 induces survival of hematopoietic progenitor cells. *J Biol Chem* 278, 22006-22013.
- Leary, A. G., Zeng, H. Q., Clark, S. C., and Ogawa, M. (1992). Growth factor requirements for survival in G0 and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4013-4017.
- Lemischka, I. (2002a). A few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp Hematol* 30, 848-852.
- Lemischka, I. (2002b). Rethinking somatic stem cell plasticity. *Nat Biotechnol* 20, 425.
- Li, C. L., and Johnson, G. R. (1994). Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* 84, 408-414.
- Li, D. Y., Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Urness, L. D., Davis, E. C., Taylor, D. G., Boak, B. B., and Wendel, D. P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534-1537.
- Li, X., Zhao, X., Fang, Y., Jiang, X., Duong, T., Fan, C., Huang, C. C., and Kain, S. R. (1998). Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 273, 34970-34975.
- Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., et al. (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296, 497.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., et al. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7, 1194-1201.
- Mancuso, P., Burlini, A., Pruner, G., Goldhirsch, A., Martinelli, G., and Bertolini, F. (2001). Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 97, 3658-3661.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- Martin-Rendon, E., and Watt, S. M. (2003). Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 122, 877-891.
- Matsumoto, K., Yasui, K., Yamashita, N., Horie, Y., Yamada, T., Tani, Y., Shibata, H., and Nakano, T. (2000). In vitro proliferation potential of AC133 positive cells in peripheral blood. *Stem Cells* 18, 196-203.
- McCulloch, E. A. (2003). Stem cells and diversity. *Leukemia* 17, 1042-1048.
- McKay, R. (2000). Stem cells--hype and hope. *Nature* 406, 361-364.
- McKinney-Freeman, S. L., Jackson, K. A., Camargo, F. D., Ferrari, G., Mavilio, F., and Goodell, M. A. (2002). Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1341-1346.
- McLaren, A. (2001). Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 414, 129-131.
- Metcalf, D. (1999). Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct? *Ann N Y Acad Sci* 872, 289-303; discussion 303-284.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., and McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.
- Minegishi, N., Suzuki, N., Yokomizo, T., Pan, X., Fujimoto, T., Takahashi, S., Hara, T., Miyajima, A., Nishikawa, S., and Yamamoto, M. (2003). Expression and domain-specific function of GATA-2 during differentiation of the hematopoietic precursor cells in midgestation mouse embryos. *Blood* 102, 896-905.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., Bray, R. A., Waller, E. K., Buck, D. W., Zanjani, E. D., et al. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning
- Yin, A. H., Miraglia S., Zanjani E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Lea, A. G., Olweus, J., Kearney, J. and Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5013-5021.
- Moore, M. A. (2002). Putting the neo into neoangiogenesis. *J Clin Invest* 109, 313-315.

- Moore, M. A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol* 18, 279-296.
- Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Hemmati, H. D., Wright, D. E., and Weissman, I. L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124, 1929-1939.
- Morrison, S. J., and Weissman, I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661-673.
- Murray, L. J., Young, J. C., Osborne, L. J., Luens, K. M., Scollay, R., and Hill, B. L. (1999). Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division. *Exp Hematol* 27, 1019-1028.
- Muul, L. M., Tuschong, L. M., Soenen, S. L., Jagadeesh, G. J., Ramsey, W. J., Long, Z., Carter, C. S., Garabedian, E. K., Alleyne, M., Brown, M., et al. (2003). Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 101, 2563-2569. Epub 2002 Nov 2527.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., et al. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.
- Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., and Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., and Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- Petzer, A. L., Hogge, D. E., Landsdorf, P. M., Reid, D. S., and Eaves, C. J. (1996). Self-renewal of primitive human hematopoietic cells (long-term-culture-initiating cells) in vitro and their expansion in defined medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1470-1474.
- Piacibello, W., Sanavio, F., Severino, A., Dane, A., Gammaioni, L., Fagioli, F., Perissinotto, E., Cavalloni, G., Kollet, O., Lapidot, T., and Aglietta, M. (1999). Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 93, 3736-3749.
- Pierelli, L., Scambia, G., Bonanno, G., Rutella, S., Puggioni, P., Battaglia, A., Mozzetti, S., Marone, M., Menichella, G., Rumi, C., et al. (2000).

- CD34+/CD105+ cells are enriched in primitive circulating progenitors residing in the G0 phase of the cell cycle and contain all bone marrow and cord blood CD34+/CD38low/- precursors. *Br J Haematol* 108, 610-620.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Prockop, D. J., Gregory, C. A., and Spees, J. L. (2003). One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11917-11923. Epub 2003 Sep 11917.
- Quirici, N., Soligo, D., Caneva, L., Servida, F., Bossolasco, P., and Deliliers, G. L. (2001). Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 115, 186-194.
- Raff, M. (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 1-22.
- Rafii, S. (2000). Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105, 17-19.
- Rafii, S., and Lyden, D. (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9, 702-712.
- Rappold, I., Ziegler, B. L., Kohler, I., Marchetto, S., Rosnet, O., Birnbaum, D., Simmons, P. J., Zannettino, A. C., Hill, B., Neu, S., et al. (1997). Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood* 90, 111-125.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 73-91.
- Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H. G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R., and Doetschman, T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102, 471-478.
- Rosnet, O., Buhring, H. J., Marchetto, S., Rappold, I., Lavagna, C., Sainty, D., Arnoulet, C., Chabannon, C., Kanz, L., Hannum, C., and Birnbaum, D. (1996). Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 10, 238-248.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, S. Krawetz, undS. Misener, eds. (Totowa, NJ, Humana Press), pp. 365-386.
- Saalbach, A., Hildebrandt, G., Haustein, U. F., and Anderegg, U. (2002). The Thy-1/Thy-1 ligand interaction is involved in binding of melanoma cells to activated Thy-1-positive microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 64, 86-93.

- Sabin, F. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red blood-corpuscles as seen in the living blastoderm of chicks during the second day of incubation. Contributions to embryology 9, 213-216.
- Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., and Nagai, R. (2002). Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. Nat Med 8, 403-409.
- Sato, T., Laver, J. H., and Ogawa, M. (1999). Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. Blood 94, 2548-2554.
- Schmeisser, A., and Strasser, R. H. (2002). Phenotypic overlap between hematopoietic cells with suggested angioblastic potential and vascular endothelial cells. J Hematother Stem Cell Res 11, 69-79.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K. D., Schuh, A. C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. Cell 89, 981-990.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 376, 62-66.
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., et al. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood 92, 362-367.
- Shih, C. C., Hu, M. C., Hu, J., Medeiros, J., and Forman, S. J. (1999). Long-term ex vivo maintenance and expansion of transplantable human hematopoietic stem cells. Blood 94, 1623-1636.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. J Cell Comp Physiol 59, 223-239.
- Shivdasani, R. A., Mayer, E. L., and Orkin, S. H. (1995). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL. Nature 373, 432-434.
- Shortman, K., and Wu, L. (1996). Early T lymphocyte progenitors. Annu Rev Immunol 14, 29-47.
- Sitnicka, E., Buza-Vidas, N., Larsson, S., Nygren, J. M., Liuba, K., and Jacobsen, S. E. (2003). Human CD34+ hematopoietic stem cells capable of multilineage engrafting NOD/SCID mice express flt3: distinct flt3 and c-kit expression and response patterns on mouse and candidate human hematopoietic stem cells. Blood 102, 881-886.
- Small, D., Levenstein, M., Kim, E., Carow, C., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Burrow, C., Ratajczak, M. Z., Gewirtz, A. M., and et al. (1994). STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 459-463.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. Nature 414, 98-104.

- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M., and Steinhoff, G. (2003). Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361, 45-46.
- Storms, R. W., Goodell, M. A., Fisher, A., Mulligan, R. C., and Smith, C. (2000). Hoechst dye efflux reveals a novel CD7(+)CD34(-) lymphoid progenitor in human umbilical cord blood. *Blood* 96, 2125-2133.
- Stump, M. M., Jordan, G. L., Jr., DeBakey, M. E., and Halpert, B. (1963). Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub. *Am J Pathol* 43, 361-367.
- Suda, T., Suda, J., and Ogawa, M. (1984). Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2520-2524.
- Sumikuma, T., Shimazaki, C., Inaba, T., Ochiai, N., Okano, A., Hatsuse, M., Ashihara, E., and Nakagawa, M. (2002). CD34+/CD90+ cells infused best predict late haematopoietic reconstitution following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Br J Haematol* 117, 238-244.
- Szilvassy, S. J., Humphries, R. K., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C., and Eaves, C. J. (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8736-8740.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J. M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5, 434-438.
- Tavian, M., Coulombel, L., Luton, D., Clemente, H. S., Dieterlen-Lievre, F., and Peault, B. (1996). Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. *Blood* 87, 67-72.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Till, J. E., and Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Tsai, F. Y., and Orkin, S. H. (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89, 3636-3643.
- Tse, H. F., Kwong, Y. L., Chan, J. K., Lo, G., Ho, C. L., and Lau, C. P. (2003). Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361, 47-49.
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., Tsukamoto, A. S., Gage, F. H., and Weissman, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720-14725.

- Vavrova, J., Filip, S., Vokurkova, D., Blaha, M., Vanasek, J., and Jebavy, L. (1999). Ex vivo expansion CD34+/AC133+-selected autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) in high-risk breast cancer patients receiving intensive chemotherapy. *Hematol Cell Ther* 41, 105-112.
- Verfaillie, C. M. (2002). Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol* 3, 314-317.
- Verfaillie, C. M., Schwartz, R., Reyes, M., and Jiang, Y. (2003). Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 996, 231-234.
- Visvader, J. E., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (1998). Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* 12, 473-479.
- Vormoor, J., Lapidot, T., Pflumio, F., Risdon, G., Patterson, B., Broxmeyer, H. E., and Dick, J. E. (1994). Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 83, 2489-2497.
- Wahlers, A., Schwieger, M., Li, Z., Meier-Tackmann, D., Lindemann, C., Eckert, H. G., von Laer, D., and Baum, C. (2001). Influence of multiplicity of infection and protein stability on retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells. *Gene Ther* 8, 477-486.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897-901.
- Watt, F. M., and Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427-1430.
- Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287, 1442-1446.
- Wetzel, A., Chavakis, T., Preissner, K. T., Sticherling, M., Haustein, U. F., Anderegg, U., and Saalbach, A. (2004). Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol* 172, 3850-3859.
- Williams, D. A. (1993). Ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells--robbing Peter to pay Paul? *Blood* 81, 3169-3172.
- Williams, D. E., Boswell, H. S., Floyd, A. D., and Broxmeyer, H. E. (1985). Pluripotential hematopoietic stem cells in post-5-fluorouracil murine bone marrow express the Thy-1 antigen. *J Immunol* 135, 1004-1011.
- Williams-DA, S.-C. a. (1995). *Blood: Principles and practice of hematology* (Philadelphia, J. B. Lippincott Company).
- Yagi, M., Ritchie, K. A., Sitnicka, E., Storey, C., Roth, G. J., and Bartelmez, S. (1999). Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8126-8131.

- Yamamoto, Y., Yasumizu, R., Amou, Y., Watanabe, N., Nishio, N., Toki, J., Fukuhara, S., and Ikehara, S. (1996). Characterization of peripheral blood stem cells in mice. *Blood* 88, 445-454.
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J., and Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P., and Smith, A. G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.
- Zeigler, F. C., Bennett, B. D., Jordan, C. T., Spencer, S. D., Baumhueter, S., Carroll, K. J., Hooley, J., Bauer, K., and Matthews, W. (1994). Cellular and molecular characterization of the role of the flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood* 84, 2422-2430.

## 8 ABKÜRZUNGEN

AGM Region	Aorta-Gonaden-Mesonephros Region
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CFU-E	Colony Forming Unit Erythrocyte
CFU-EC	Colony Forming Unit Endothelial Cell
CFU-G	Colony Forming Unit Granulocyte
CFU-GEMM	Colony Forming Unit Granulocyte
	Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte
CFU-GM	Colony Forming Unit Granulocyte
	Monocyte
CFU-M	Colony Forming Unit Monocyte
CLP	Common Lymphoid Precursor
CMP	Common Myeloid Precursor
CP	Crossing Point
d	Tag
DNase	Desoxyribonuklease
EC	Endothelzelle
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ErP	Erythrocyte Precursor
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FLT3	FLT-Like Tyrosine Kinase 3
FLT3L	FLT-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand
FMCV	Friend Mink Cell Focus Forming Virus
FMEV	Friend Murine Embryonic Stem Cell Virus
GATA-2	GATA Binding Protein 2
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GMP	Granulocyte Monocyte Precursor
HGF	Hepatocyte Growth Factor

HSA	Humanes Serumalbumin
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
HUVEC	Humane Vaskuläre Endothelzellen
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco Medium
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
LIF	Leukemia Inhibiting Factor
Lin-	Lineage-negativ
LTR	Long-Terminal Repeat
M	Molar
MACS	Magnetic Cell Sorting
MESV	Murine Embryonic Stem Cell Virus
MGDF	Megacaryocyte Growth and Development Factor
min	Minute
MkP	Megakaryocyte Erythrocyte Precursor
ml	Milliliter
MNC	Mononukleäre Zellen
MSC	Mesenchymale Stammzellen
ng	Nanogramm
NOD-SCID	Non Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
p-SP	paraaoortalen Splanchnopleura
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SCGF	Stem Cell Growth Factor
SCL	Stem Cell Leukemia
SFFVp	Polythymic Spleen Focus Forming Virus
TPO	Thrombopoietin
Ulex	Ulex europaeus Rezeptor
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	VEGF Rezeptor-2
vWF	Von Willebrand Faktor

## **9 DANKSAGUNG**

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. W. Fiedler, für die Überlassung des sehr interessanten Promotionsthemas. Ich möchte ihm außerdem herzlich für die intensive Betreuung und Diskussionsbereitschaft danken, die wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Bei Herrn Professor Dr. W. Fiedler bedanke ich mich auch für das kritische Korrekturlesen des Manuskriptes.

Ich möchte dem Direktor der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik II, Professor Dr. D. K. Hossfeld, dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchführen konnte. Die kontinuierliche Unterstützung durch Herrn Professor Hossfeld hatte einen großen Anteil an der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Wienand danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. U. Gehling möchte ich für ihre Unterstützung bei der Bewerbung um das Werner-Otto Stipendium, für ihre Diskussionsbereitschaft während meiner Doktorarbeit und für die Hilfe bei der Auswertung der Colony-Assays danken.

Dass ich mich so intensiv der wissenschaftlichen Arbeit widmen konnte, verdanke ich der Werner-Otto Stiftung, deren Stipendium mir von 1999-2001 die notwendigen finanziellen Freiräume eröffnete.

Ich möchte mich bei Frau Uta Fischer für ihre tatkräftige Hilfe und für das gute Arbeitsklima von 2001 bis 2003 bedanken. Außerdem danke ich Herrn Martin Butzal und Frau Melanie Aykurt für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Allen Laborkollegen aus dem Pavillon 29 danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Allen Mitarbeitern der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf, welche die Leukaphereseprodukte zur Verfügung stellten, bin ich zu Dank verpflichtet.

Ich danke PD Dr. B. Fehse und Frau Dung Ung für die Hilfe bei der retroviralen Transduktion der Stammzellen.

Herrn Dr. B. Schiedlmeier, Frau Dr. C. Stocking, Herrn PD Dr. Harbers, Frau G. Arman-Calcek und allen Mitarbeitern des Tierstalles des Heinrich-Pette Instituts

danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der NOD-SCID Experimente.

Ich danke außerdem Frau R. Gehrcke und Frau C. Babista für ihre Hilfe bei der Präparation des Knochenmarks der Mäuse.

Frau Janine Kraunus möchte ich herzlich für ihre Hilfe bei der Formatierung der Arbeit und für die moralische Unterstützung danken.

Meinen Eltern danke ich für die liebevolle Unterstützung und Geduld, die sie mir entgegenbringen und die mir viel Kraft gibt. Meinem Vater, Herrn W. Loges, danke ich besonders für das Korrekturlesen des Manuskriptes.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann, Dr. P. Kunkel, für seine Liebe und emotionale Unterstützung, die vieles leichter macht. Ich möchte ihm außerdem für seine Hilfe bei verschiedenen Computerproblemen danken.