

Diplomarbeit

**ERHEBUNG VON DATEN ÜBER DIE QUALITÄT VON
HÄMATOPOIETISCHEN STAMM- UND
PROGENITORZELLEN IN EINEM IN VITRO MODELL**

eingereicht von

Asmira Samardzic

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Pädiatrische Hämato-/Onkologie

unter Anleitung von

Ao. Univ. Prof. Dr. Wolfgang Schwinger

und

PD. Drⁱⁿ. Ingeborg Stelzer

I. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 19.06.2019

Asmira Samardzic eh.

II. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schwinger bedanken, der mir das Mitarbeiten an diesem interessanten Projekt ermöglichte, indem er mich in das Arbeitsteam aufnahm.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ingeborg Stelzer für ihr außerordentliches Engagement und die herzliche Betreuung in jeder Phase der Diplomarbeit.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Mag. Dr. Robert Fuchs und meinem Studienkommilitonen Martin Rinofner für die Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeit sowie den biomedizinischen Analytikern für ihre großartige Arbeit bei der Zellkultur.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Julia Kröpfl für die Hilfestellung bei der Interpretation und Bearbeitung der Ergebnisse.

Weiters möchte ich mich aufrichtig bei meinem Familien- und Freundeskreis und insbesondere bei meinem Lebensgefährten für die Unterstützung während der letzten Jahre bedanken.

III. INHALTSVERZEICHNIS

I. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	II
II. DANKSAGUNG	III
III. INHALTSVERZEICHNIS	IV
IV. GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	VI
V. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
VI. TABELLENVERZEICHNIS	XII
VII. ZUSAMMENFASSUNG	XVI
VIII. ABSTRACT	XVII
1 EINLEITUNG	1
1.1 HÄMATOPOIETISCHE STAMMZELLEN	1
1.1.1 STAMMZELLENTWICKLUNG	1
1.1.2 HÄMATOPOESE	4
1.1.3 STAMMZELLNISCHE	6
1.1.4 KULTIVIERUNG DER STAMMZELLEN	15
1.2 NABELSCHNURBLUT	18
1.2.1 NABELSCHNURBLUTTRANSPLANTATION	19
1.2.2 HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	24
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 KULTIVIERUNG DES ZELLMATERIALS	25
2.1.1 GEWINNUNG, ISOLIERUNG UND SEPARIERUNG	25
2.1.2 PASSAGIERUNG	27
2.2 COLONY-FORMING-CELL-ASSAY	28
2.2.1 PRIMÄRANSATZ	28
2.2.2 SEKUNDÄRANSATZ	32
3 ERGEBNISSE	33
3.1 PRIMÄRANSATZ DER MNCs UND DER CD34+ ZELLEN	33
3.1.1 PRIMÄRANSATZ DER MNCs	34
3.1.2 PRIMÄRANSATZ DER CD34+ ZELLEN	37
3.1.3 VERLAUF DER MNCs UND CD34+ ZELLEN	40
3.2 CFU-GM UND BFU-E	49
3.2.1 CFU-GM UND BFU-E DER MNCs	49
3.2.2 CFU-GM UND BFU-E DER CD34+ ZELLEN	55

3.2.3	VERLAUF DER CFU-GM UND BFU-E	60
3.2.4	PROZENTUALE VERÄNDERUNG DER CFU-GM UND BFU-E	72
4	DISKUSSION	77
5	LITERATURVERZEICHNIS	89
6	ANHANG	95
6.1	QUALITÄTSKRITERIEN, REAGENZIEN UND EINMALARTIKEL	95
6.1.1	QUALITÄTSKRITERIEN	95
6.1.2	REAGENZIEN	95
6.1.3	EINMALARTIKEL	97
6.2	TABELLEN	99

IV. GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN

ACDA: Acid-Citrat-Dextrose-Lösung A; Antikoagulans

ANG-1: Angiopoietin 1; Ligand von Tie-2

ANGPTL: Angiopoietin like protein; Wachstumsfaktor der HSCs

BFUs: burst forming units; unreifste Form der hämatopoietischen Progenitorzellen

BFU-E: BFUs of erythrocytes; Progenitorzellen der Erythrozyten

BMP-4: Bone morphogenetic protein 4; Wachstumsfaktor der HSCs

BMT: Bone marrow transplantation; HCT mit aus Knochenmark gewonnenen Stamm- und Progenitorzellen

CBT: Cord blood transplantation; HCT mit aus Nabelschnurblut isolierten Stamm- und Progenitorzellen

CD34+ Zellen: CD34-positive Zellen

CFCs: colony forming cells; hämatopoietische Progenitorzellen

CFUs: colony forming units; hämatopoietische Progenitorzellen

CFU-GM: CFUs of granulocytes and monocytes; Progenitorzellen der Granulo- und Monozyten

CMF-PBS: Calcium-Magnesium-free phosphate-buffered-saline; Supplement in Zellkultursystemen

CXCL-12: CXC motiv chemokin ligand 12, auch SDF1; Zytokin

CXCR-4: CXC motiv chemokin receptor 4; Zytokinrezeptor

dCBT: Double unit cord blood transplantation; CBT mit zwei Nabelschnurbluteinheiten

dmPGE2: stabiles Derivat des Prostaglandin E2

DFS: Disease-free survival

ECM: Extracellular matrix; Nicht-zelluläre Komponente von Gewebe

ECs: Endothel cells

EGE: European Group on Ethics in Science and New Technologies; ein unabhängiges Beratungsgremium des Präsidenten der Europäischen Kommission;

Engraftment: Einbau von transplantiertem Gewebe in den Körper des Wirts

EPO: Erythropoietin; Zytokin, stimuliert Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen zu Erythrozyten

Erythroblast: Vorläuferzellen der Erythropoese

Fanconi-Anämie: vererbte Form von Anämie

FBS: fetal bovine serum; Supplement in Zellkultursystemen

FGF-1: Fibroblast growth factor 1

FLT-3/ FLK-2 Ligand: Fms-like tyrosine kinase-3/ fetal liver kinase-2 Ligand; Zytokin

G0-Phase: Ruhephase des Zellzyklus

G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor; Zytokin, stimuliert Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen zu Granulozyten

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; Zytokin, stimuliert Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen zu Granulozyten und Makrophagen

GvHD: Graft-versus-Host-Disease, Komplikation einer allogenen HCT; akute GvHD: von Tag1 bis Tag 100 nach Transplantation, danach: chronische GvHD

GvL: Graft versus leukemia; erwünschte Reaktion nach einer allogenen HCT, Transplantat greift Leukämiezellen an, es kommt seltener zum Wiederauftreten der Krankheit

Hämatopoese: Bildung der Blutzellen

HCT: Hematopoietic cell transplantation

HLA: Human leukocyte antigen, auch Histokompatibilitätsantigen; Gene, welche Proteine zur Immunerkennung kodieren

Homing: Austritt der HSPCs aus dem Blutkreislauf in die SCN

HSCs: Hematopoietic stem cells

HSPCs: Hematopoietic stem and progenitor cells

IGF: Insulin like growth factor; insulinähnlicher Wachstumsfaktor

IGFBP: Insulin like growth factor binding protein; Bindeproteine der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren

IL: Interleukin; Zytokin

IMDM®: Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Kulturmedium

iPS: Induced pluripotent stem cells; pluripotente SCs, die durch künstliche Reprogrammierung aus somatischen Zellen generiert wurden

IT-HSCs: intermediate HSCs; HSCs mit Fähigkeit zur Selbsterneuerung für 6-12 Monaten

Jagged-1: Ligand des Notch-Rezeptors

LEPR: Leptin receptor; Zytokinrezeptor

Leukämie: maligne hämatopoietische Erkrankung

LTC-ICs: Long-term culture initiating cells; primitivste Form der Progenitorzellen in vitro

LT-HSCs: Long-term HSCs; HSCs mit Fähigkeit zur Selbsterneuerung von >12 Monaten

Maintenance: Aufrechterhaltung des SC-Pools

Methocult® (Methocult® H4534 classic without/ with EPO, Stem Cell Technologies, Vancouver/Canada); Kulturmedium

MNCs: Mononuclear cells

Mobilisation: Austritt der HSPCs aus der SCN in den Blutkreislauf

M-OSTs: aus mesenchymalen Stromazellen generierte Osteoblasten

MSCs: Mesenchymal stem cells

NAM: Nicotinamide

Notch-Rezeptors: Rezeptor von Jagged-1

NMR: Non-relapse mortality; therapiebedingte Mortalität

OS: Overall survival rate; Prozentsatz von Patienten/-innen in einer Studie, die nach einem bestimmten Zeitraum nach einer Diagnose oder Therapieeinleitung noch am Leben sind

Passagieren: Überführen von Zellen in ein Kulturgefäß; ferner Passage(zahl) einer Kultur: Anzahl der überführten Kulturen

PBCT: Peripheral blood cell transplantation; HCT mit aus dem peripheren Blut isolierten Stamm- und Progenitorzellen

PBSPCs: Peripheral blood stem and progenitor cells; Stamm- und Progenitorzellen aus dem peripheren Blut

PTH-Rezeptoren: Parathormon-Rezeptor

PVCs: Perivascular stromal cells

Quiescence: Ruhezustand der HSCs, sie verharren in der G₀-Phase des Zellzyklus

R: Relapse

RD: Related donor

ROS: reaktive Sauerstoffspezies; gehören zu Radikalen, Merkmal aeroben Metabolismus

sCBT: Single unit cord blood transplantation; CBT mit einer Nabelschnurbluteinheit

SCF: Stem cell factor; Zytokin

SCN: Stem cell niche

SCs: Stem cells

SDF-1: Stromal cell-derived factor 1, auch CXCL-12; Zytokin

Self-renewing: Selbsterneuerung der HSCs

Seneszenz: Zellaltern durch Verkürzung der Chromosomenenden bei Replikation der DNA

SLAM-family: Signaling lymphocytic activation molecule family; spezifische Marker unterschiedlicher Subpopulationen der HSPCs

ST-HSCs: Short-term HSCs; HSCs mit Fähigkeit zur Selbsterneuerung von <6 Monaten

TGF- β : Transforming growth factor beta; Wachstumsfaktor

Tie-2: Tyrosine protein kinase receptor 2; Rezeptor von ANG-1

TPO: Thrombopoietin; Zytokin, stimuliert Proliferation und Differenzierung der Megakaryozyten zu Thrombozyten

UCB-HSPCs: HSPCs from umbilical cord blood

UD: Unrelated donor

VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1, Ligand von VLA-4

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VLA-4: Very late antigen 4, Rezeptor von VCAM-1

WMDA: World Marrow Donor Association; fördert internationale Zusammenarbeit, um den Austausch von hochwertigen HSCs für weltweite klinische Transplantation zu erleichtern und Interessen der Spender/-innen zu fördern

V. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Modell der HSC-Hierarchie.....	5
Abbildung 2: Lokalisation der SCN	7
Abbildung 3: Stammzellnische.....	13
Abbildung 4: Aufteilungsschema in 12 Mikrotiterplatte ohne EPO.....	30
Abbildung 5: Aufteilungsschema in 12 Mikrotiterplatte mit EPO	30
Abbildung 6: Verlauf der MNCs der HSC 15/16/17/19/21.....	47
Abbildung 7: Verlauf der CD34+ Zellen der HSC 15/16/17/19/21.....	48
Abbildung 8: Verlauf der CFU-GM und BFU-E der MNCs der HSC 15/16/17/19/21.	70
Abbildung 9: Verlauf der CFU-GM und BFU-E der CD34+ Zellen der HSC 15/16/17/19/21.....	71
Abbildung 10: Abnahme der CFU-GM der MNCs der HSC 16/17/19	73
Abbildung 11: Abnahme der BFU-E der MNCs der HSC 16/17/19.....	74
Abbildung 12: Abnahme der CFU-GM der CD34+ der HSC 16/17/19	75
Abbildung 13: Abnahme der BFU-E der CD34+ der HSC 16/17/19	76

VI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile embryonaler und adulter Stammzellen.....	3
Tabelle 2: Angewandte Bezeichnungen der SCs	3
Tabelle 3: Primäransatz der MNCs der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	34
Tabelle 4: Primäransatz der MNCs der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	35
Tabelle 5: Primäransatz der MNCs der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	35
Tabelle 6: Primäransatz der MNCs der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	36
Tabelle 7: Primäransatz der MNCs der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	36
Tabelle 8: Primäransatz der CD34+ der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	37
Tabelle 9: Primäransatz der CD34+ der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	38
Tabelle 10: Primäransatz der CD34+ der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	38
Tabelle 11: Primäransatz der CD34+ der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	39
Tabelle 12: Primäransatz der CD34+ der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	39
Tabelle 13: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	40
Tabelle 14: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	41
Tabelle 15: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	42
Tabelle 16: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	43

Tabelle 17: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	44
Tabelle 18: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	44
Tabelle 19: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	45
Tabelle 20: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	45
Tabelle 21: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	46
Tabelle 22: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	46
Tabelle 23: CFU-GM der MNCs der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	49
Tabelle 24: BFU-E der MNCs der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	50
Tabelle 25: CFU-GM der MNCs der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	51
Tabelle 26: BFU-E der MNCs der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	51
Tabelle 27: CFU-GM der MNCs der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	52
Tabelle 28: BFU-E der MNCs der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	52
Tabelle 29: CFU-GM der MNCs der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	53
Tabelle 30: BFU-E der MNCs der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	53
Tabelle 31: CFU-GM der MNCs der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	54
Tabelle 32: BFU-E der MNCs der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	54
Tabelle 33: CFU-GM der CD34+ der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	55

Tabelle 34: BFU-E der CD34+ der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	55
Tabelle 35: CFU-GM der CD34+ der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	56
Tabelle 36: BFU-E der CD34+ der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	56
Tabelle 37: CFU-GM der CD34+ der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	57
Tabelle 38: BFU-E der CD34+ der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	57
Tabelle 39: CFU-GM der CD34+ der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	58
Tabelle 40: BFU-E der CD34+ der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	58
Tabelle 41: CFU-GM der CD34+ der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	59
Tabelle 42: BFU-E der CD34+ der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	59
Tabelle 43: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	60
Tabelle 44: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	61
Tabelle 45: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	62
Tabelle 46: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	63
Tabelle 47: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien	64
Tabelle 48: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	65
Tabelle 49: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	66
Tabelle 50: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	67

Tabelle 51: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	68
Tabelle 52: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien.....	69
Tabelle 53: Prozentuale Veränderung der CFU-GM und BFU-E der MNCs zur Darstellung der prozentualen Abnahme der weißen und roten Kolonien der MNCs.	72
Tabelle 54: Prozentuale Veränderung der CFU-GM und BFU-E der CD34+ zur Darstellung der prozentualen Abnahme der weißen und roten Kolonien der CD34+	72
Tabelle 55: Reinheit der Proben	99

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Trotz aller Bemühungen besteht bis heute kein Konsens über die optimalen Kultivierungstechniken für klinisch orientierte in vitro Zellexpansion. Ein genaues Verständnis über das komplexe Zusammenspiel zwischen den hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) und der Stammzellnische (SCN) ist wichtig, um therapeutische Ansätze für unterschiedliche hämatologische und nicht-hämatologische Krankheitsbilder zu erforschen. Deshalb wurde die Fragestellung in dieser Studie dahingehend gestellt, ob die Prozesse der Kultivierung Auswirkungen auf die Qualität (Self-renewal und Expansion) der aus Nabelschnurblut isolierten HSPCs (UCB-HSPCs), insbesondere der Progenitorzellen der Granulo-, Mono- (CFU-GM) und Erythrozyten (BFU-E), haben. Die Hypothese war, dass im Langzeitkulturmodell die HSPCs im Verlauf der Passagierung durch verschiedene Mechanismen in ihrer Zellexpansion (Proliferationskapazität) abnehmen. Im Gesamten zeigte sich, mit Ausnahme der CFU-GM der MNCs, eine Abnahme der Proliferationskapazität mit zunehmender Passagierung. Diese war bei den roten Kolonien stärker ausgeprägt als bei den weißen und ging letztlich mit einem Verlust der Kapazität, Kolonien zu bilden, einher. Nach 1,5 Monaten (Passage 6,5) verzeichneten die CFU-GM der CD34+ Zellen eine Abnahme der Kolonienbildung von ca. 81%; wohingegen die BFU-E der CD34+ Zellen eine Abnahme von >99% aufwiesen. Die roten Kolonien der MNCs hatten bereits nach einem Monat (Passage 4,5) die Fähigkeit, BFU-E zu bilden, verloren.

Konklusion: Aufgrund der aktuellen Datenlage, des geringen klinischen Einsatzes der Nabelschnurblut-Transplantationen (CBTs), und anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, kann die Transplantation von in vitro kultivierten und expandierten UCB-HSPCs, als Stammzellressource, nicht befürwortet werden. Zu betonen bleibt, dass das Nabelschnurblut eine zu kostbare Stammzellquelle darstellt, als dass es nach der Geburt einfach der Entsorgung zugeführt wird und nicht einer Verwendung bzw. der Forschung zu Gute kommt.

VIII. ABSTRACT

Despite all efforts, there is still no consensus about the optimal culture techniques for clinically oriented in vitro cell expansion. An in-depth understanding of the complex interaction between hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) and stem cell niche (SCN) is important to explore therapeutic approaches to different hematological and non-hematological diseases. Therefore, the purpose of this study was to determine if the cultivation processes have an impact on the quality (self-renewal and expansion) of umbilical cord blood-isolated HSPCs (UCB-HSPCs), in particular progenitor cells of granulo-, mono- (CFU-GM) and erythrocytes (BFU-E). The hypothesis was that in the long-term culture model, HSPCs decrease in their cell expansion (proliferative capacity) during the course of their passage through various mechanisms. Overall, except for the CFU-GM of the MNCs, there was a decrease in proliferation capacity with increasing passaging. This was more pronounced in the red colonies than in the white ones and was ultimately associated with a loss of capacity to form colonies. After 1.5 months (passage 6.5), CFU-GM of CD34 + cells showed a decrease in colony formation of about 81%; whereas the BFU-E of the CD34 + cells had a decrease of >99%. The red colonies of the MNCs had already lost the ability to form BFU-E after one month (passage 4,5).

Conclusion: Based on the current data, the low clinical use of cord blood transplantations (CBTs), and the results of the present work, the transplantation of in vitro cultured and expanded UCB-HSPCs, for use in stem cell transplantation, cannot be supported. It should be emphasized that umbilical cord blood is too precious a stem cell source to be simply disposed of after birth and not to be used or put to research.

1 EINLEITUNG

1.1 HÄMATOPOIETISCHE STAMMZELLEN

1.1.1 STAMMZELLENTWICKLUNG

Stammzellen (SCs) sind undifferenzierte Zellen, welche durch die Eigenschaft, sich zu differenzieren und gleichzeitig selbst erneuern zu können, gekennzeichnet sind. (1) Ihre Funktion besteht darin, untergegangene Zellen zu ersetzen. Der Terminus Stammzelle lässt sich auf das Jahr 1909 zurückführen, als er vom russischen Anatomen und Pathologen Alexander Maximow begründet wurde. (2) Jahrzehnte später, in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts, leisteten die kanadischen Wissenschaftler Till J., McCulloch E. und Siminovitch L. Pionierarbeiten für den Beweis der Existenz von hämatopoietischen Stammzellen (HSCs). (3) Der Ursprung aller SCs liegt in der Embryonalentwicklung, genauer gesagt im Keimstadium: Mit der Entstehung der Zygote bis zum 4-Zell-Stadium sind die ersten Zellen vorhanden, welche die Eigenschaft, totipotent zu sein, besitzen. (4) Totipotent bedeutet, dass aus jeder einzelnen Zelle ein lebensfähiges Individuum entstehen kann. Anschließend am 7. Tag nach der Befruchtung entwickelt sich über verschiedene Zell-Stadien hinweg die Blastozyste. Diese besteht aus einer inneren Zellmasse, dem Embryoblasten, sowie einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblasten, und einer mit Flüssigkeit gefüllten Höhle. Während dem Embryonalstadium, zwischen der 4. und 8. Woche nach der Befruchtung, entwickelt sich aus dem Trophoblasten die Plazenta und aus der inneren Zellmasse der Embryo, welcher im Besitz pluripotenter SCs ist. Pluripotenz ist dadurch charakterisiert, dass eine Differenzierung in alle Zelllinien der drei Keimblätter, das heißt in jeden der rund 200 verschiedenen Zelltypen des Organismus, inklusive der Keimzellen, möglich ist. Diese pluripotenten Stammzellen teilen sich unbegrenzt, ohne zu altern oder ihr Differenzierungspotenzial zu verlieren. Im Unterschied zu den Totipotenten sind sie aber nicht in der Lage, extraembryonales Gewebe, welches für die Entstehung eines Embryos notwendig ist, zu bilden. Im Laufe der Entwicklung eines Individuums kommt es zu einer zunehmenden Differenzierung

der SCs. Diese sind nicht mehr pluri- sondern multipotent. Die multipotenten Stammzellen werden auch als adulte, somatische oder als gewebespezifische SCs bezeichnet. Sie befinden sich im Körper eines vollständig entwickelten Organismus, im Nabelschnurblut sowie im Fruchtwasser und werden weiter in hämatopoietische, epitheliale, mesenchymale und neuronale SCs unterteilt. Damit sind sie für die Blutbildung wie auch für die Bildung von Blutgefäßen, Binde- und Nervengewebe zuständig. (4) Da täglich allein dreihundert Milliarden Blutzellen neu gebildet werden, sind sie v.a. im Hinblick auf die begrenzte Lebensdauer der Körperzellen von Bedeutung. (5) So lassen sich SCs in zwei Arten einteilen: in diejenigen, welche sich zu allen Zelltypen des Organismus entwickeln können (toti- oder pluripotente Embryonale SCs) und in diejenigen, welche zu bestimmten Zellen spezialisierter Organe und Gewebe ausreifen können (multipotente gewebespezifische SCs). Gerade die unterschiedlichen Eigenschaften der embryonalen und adulten Stammzellen bringen gewisse Vor- und Nachteile mit sich (siehe Tabelle 1). Während sich embryonale SCs in Kultur durch Wahrung ihrer Undifferenziertheit auszeichnen, verlieren adulte SCs im Laufe des Passagierens ihre multipotente Eigenschaft. (6) Jedoch sind sie leichter zu isolieren, wohingegen die Gewinnung embryonaler SCs ethische Hürden mit sich bringt. Ein wichtiger Meilenstein der Stammzellforschung wurde im Jahre 2006 durch Yamanaka und seinem Team geschaffen, als es ihnen gelang, aus differenzierten Körperzellen pluripotente SCs zu kreieren (iPS). (7) Das Einschleusen verschiedener Gene wie z.B. Oct4 und Sox2 ermöglicht eine Reprogrammierung und schafft somit eine weitere Art an SCs. Eine Übersicht der angewandten Bezeichnungen (4, 8) bietet Tabelle 2.

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

	Embryonale Stammzellen	Adulte Stammzellen
Vorteile	In Zellkultur Vermehrbarkeit ohne Verlust ihrer Pluripotenz und ohne Auftreten von Seneszenz;	Leichte Isolierbarkeit: Gewinnung der adulten SCs aus verschiedenen Gewebe wie z.B. aus dem Knochenmark, Blut und UCB; keine ethischen Probleme;
Nachteile	Ethische Probleme; Differenzierungsprozess ist schwer zu kontrollieren: z.B. Induktion bösartiger Tumore;	In Zellkultur Verlust der Multipotenz und Auftreten von Seneszenz;

Tabelle 2: Angewandte Bezeichnungen der SCs in Abh. zum Differenzierungspotenzial

	Differenzierungspotenzial	Beispiele
Totipotent	In embryonales und extraembryonales Gewebe	Zygote
Pluripotent	In alle embryonalen Gewebearten	ES cell, iPS cell
Multipotent	In alle Zelllinien einer bestimmten Gewebeart	HSC
Oligopotent	In mehrere aber nicht alle Zelllinien einer bestimmten Gewebeart	CMP, CLP
Unipotent	In eine bestimmte Zelllinie eines bestimmten Gewebetyps	BFU-E

ES: embryonic stem, iPS: induced pluripotent stem, HSC: hematopoietic stem cell, CMP: common myeloid precursor/ progenitor, CLP: common lymphoid precursor/ progenitor, BFU-E: burst forming unit-erythroid

1.1.2 HÄMATOPOESE

Die Hämatopoietischen Stammzellen (HSCs) gehören zu den multipotenten adulten Stammzellen und sind für die Hämatopoese sowie Homöostase des Blutes im menschlichen Organismus von Bedeutung. (4) Immerhin müssen pro Stunde ca. 10^9 Erythrozyten und ca. 10^8 Leukozyten produziert werden. (9) Die HSCs sind durch drei wichtige Eigenschaften gekennzeichnet: große Selbsterneuerungskapazität, breites Differenzierungspotenzial und langes Verharren im ruhenden Zustand (G0-Phase). (4) Zudem wird in Bezug auf die HSCs eine gewisse Plastizität diskutiert, die sie dazu befähigt, in andere Zellreihen zu differenzieren. Durch Transplantations-Modelle, in welchen das Y-Chromosom als Marker verwendet wurde, konnten in weiblichen Probanden xy-positive differenzierte Zellen nachgewiesen werden. (10) Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen (HSPCs) befinden sich im Knochenmark, im Nabelschnurblut, im Fruchtwasser und werden ins periphere Blut ausgeschüttet. HSCs entwickeln sich aus den pluripotenten Stammzellen weiter zu den Vorläuferzellen der myeloischen und lymphatischen Zellreihe: dem common myeloid precursor (CMP) und dem common lymphoid precursor (CLP). (8) Über weitere Differenzierungsstufen entstehen aus den CLP die Lymphozyten und ein Teil der dendritischen Zellen. Aus den CMP entwickeln sich schließlich die Granulozyten, Makrophagen, Erythro- und Thrombozyten sowie der restliche Anteil der dendritischen Zellen. Bei den Vorläuferzellen, die auch als Progenitorzellen bezeichnet werden, handelt es sich um determinierte oligopotente Zellen, die durch eine begrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung gekennzeichnet sind. (8) In den letzten Jahren stellten Wissenschaftler wie Notta F. et al. und Ema H. et al. den klassischen hämatopoietischen Hierarchiebaum in Frage, da die HSCs weitaus heterogener zu sein scheinen, als zunächst angenommen. (11, 12) Aus diesem Grund empfehlen seit 2013 Ema H. et al. in Abhängigkeit zur Selbsterneuerungskapazität eine zusätzliche Klassifikation in short-term (ST-), intermediate (IT-) und long-term (LT-) HSCs. (12) ST-HSCs können ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung für bis zu 6 Monate, IT-HSCs über 6 Monate und LT-HSCs über 12 Monate beibehalten.

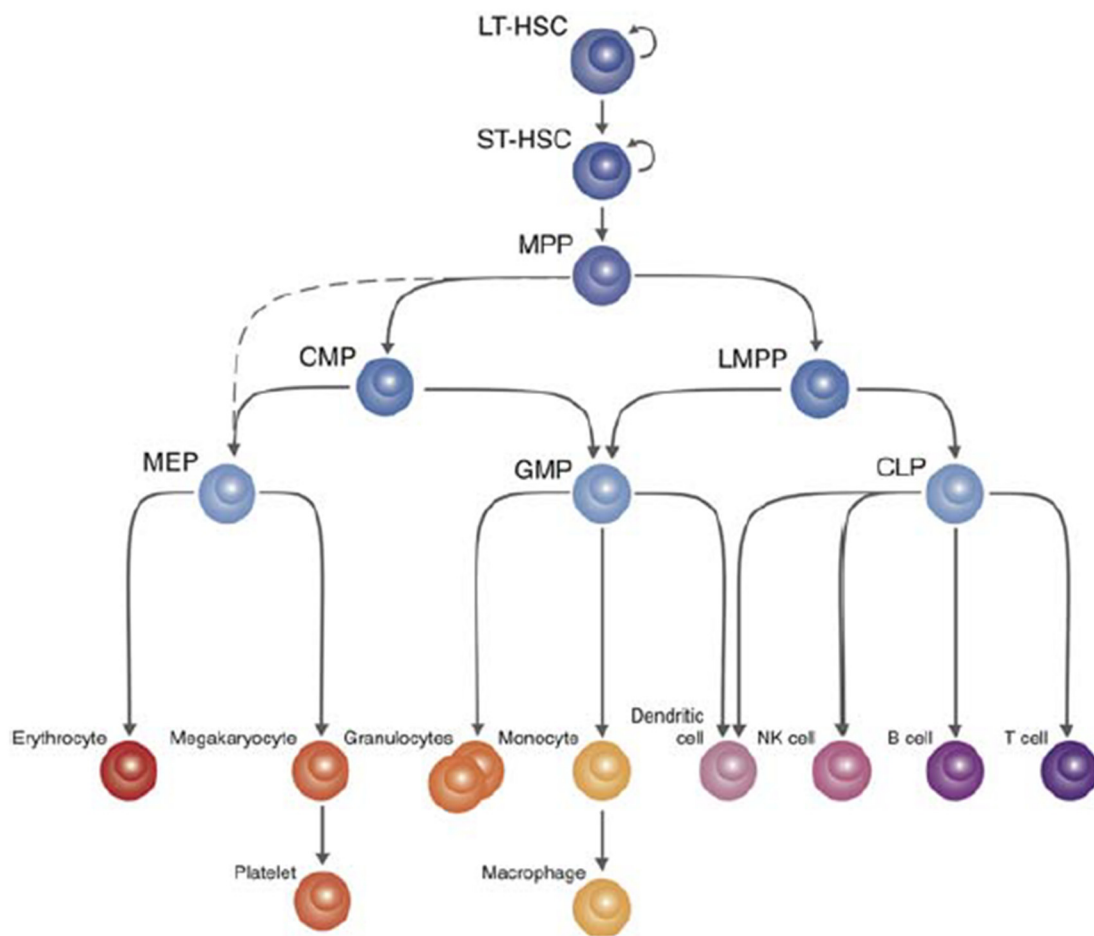


Abbildung 1: Modell der HSC-Hierarchie (Quelle: Stem Cells. 2017 Jan; 35(1): 80–88 (1))

HSC: hematopoietic stem cell, LT-HSC: long-term HSC, ST-HSC: short-term HSC, MPP: multipotent progenitor, CMP: common myeloid progenitor, LMPP: lymphoid-primed multipotent progenitor, MEP: megakaryocyte-erythroid progenitor, GMP: granulocyte-macrophage progenitor, CLP: common lymphoid progenitor, NK: natural killer

1.1.3 STAMMZELLNISCHE

Das Konzept der Stammzellnische (SCN) wurde 1978 erstmals von Schofield eingeführt. (13) Heute, etwa 40 Jahre später, werden nach und nach die komplexen Mechanismen dahinter verstanden.

Die SCN stellt eine regulierende Mikroumgebung im Knochenmark dar, bestehend aus verschiedenen Zelltypen, Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) und gelösten Molekülen. Sie wird weiter in eine endosteale Nische in der Nähe zum Endost und in eine vaskuläre Nische Richtung der zentral gelegenen Gefäße unterteilt. (14-16) Mendelson et al. wiesen in ihrer Arbeit darauf hin, dass sich 80% der HSCs in der endostealen Nische in der Nähe zu Endothelzellen befinden. (15) Die Stammzellen, welche sich nahe den Arteriolen aufhalten, verbleiben über einen längeren Zeitraum quiescent (in der G0-Phase), wohingegen die Sinusoide die Proliferation der HSCs (Self-renewal und Differenzierung) unterstützen sollen. (14) Neben den HSCs gehören auch die Mesenchymalen Stammzellen (MSCs), (17) die Perivaskulären Stromazellen (PVCs), (18-20) die Endothelzellen (ECs) (21, 22) und die Nervenfasern (23, 24) zu den wichtigen Zellakteuren der SCN. So reguliert die Interaktion verschiedener Zellen die Hämatopoese. Sie erfolgt entweder direkt über Zell-Zell- sowie über Zell-ECM-Kontakte oder indirekt über lösliche Faktoren und entscheidet letztlich über das Zellschicksal. (15) Das heißt, dass verschiedene zellintrinsische und zellextrinsische Mechanismen darüber bestimmen, ob eine Stammzelle in der G0-Phase ruht, oder ob sie Self-renewal betreibt und so für die Expansion des SC-Pools sorgt und sich durch Differenzierung weiter zu Vorläuferzellen spezialisiert. Somit ist die Nische eine Regulierungseinheit, welche über den Eintritt der HSCs in den Zellzyklus bestimmt und dadurch auf der einen Seite vor Erschöpfung des Pools schützt und auf der anderen Seite aber auch dafür sorgt, dass täglich ca. 300 Milliarden Blutzellen neu produziert werden können. (5)

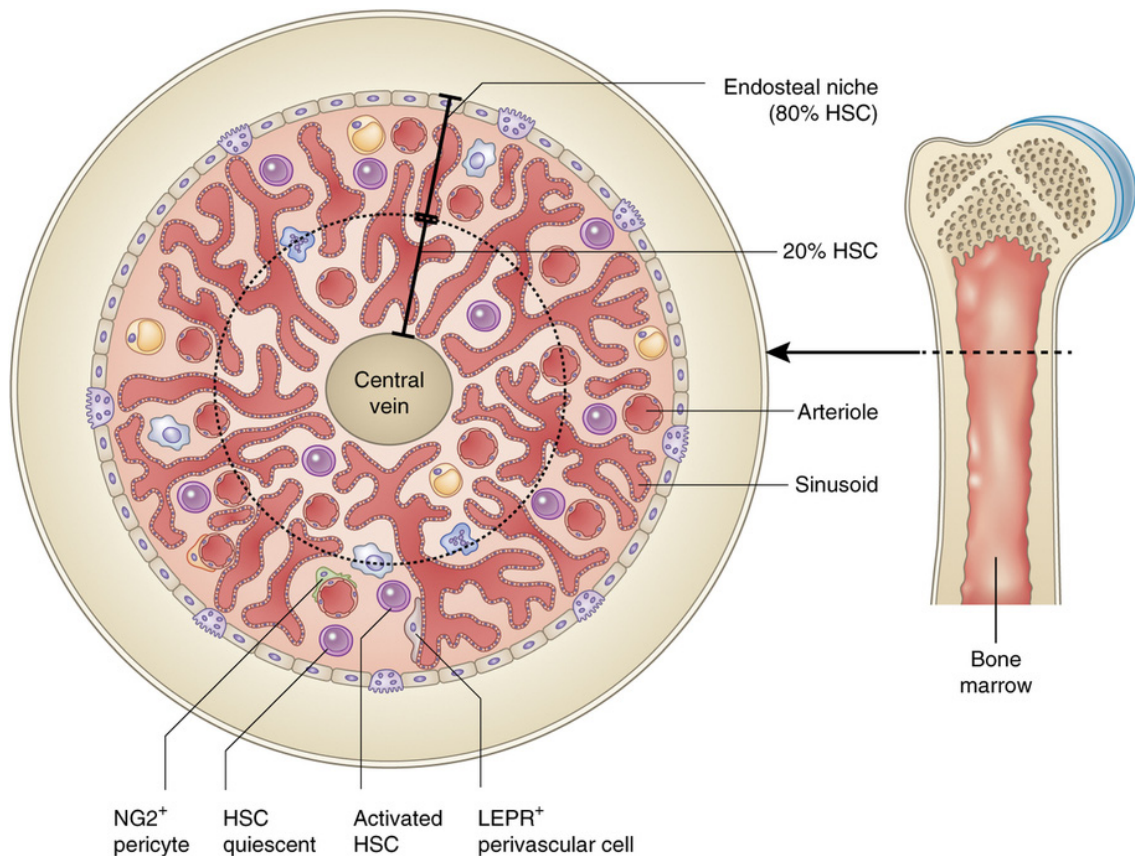


Abbildung 2: Lokalisation der SCN (Quelle: Nat Med. 2014 Aug; 20(8): 833–846 (15))

1.1.3.1 KOMPONENTEN DER STAMMZELLNISCHEN

MESENCHYMALE STAMMZELLEN

Bei den Mesenchymalen Stammzellen (MSCs) handelt es sich um eine heterogene Subpopulation von multipotenten nicht-hämatopoietischen Stammzellen, die v.a. im Knochenmark zu finden sind. (25) Außerhalb vom Knochenmark sind sie auch in anderen Geweben wie z.B. im Fettgewebe und in der Muskulatur ansässig. In vitro Kultivierungen legten an den Tag, dass sich MSCs in verschiedene Bindegewebs-Zelltypen differenzieren können, wie in Adipozyten, Muskelzellen, Osteoblasten u.v.a.m. Die ersten in vitro Untersuchungen mit aus dem Knochenmark gewonnenen MSCs ergaben, dass sich diese nicht nur zu Osteoblasten differenzieren, sondern auch durch Produktion hämatopoietischer Zytokine wie IL-6, GM-CSF, G-CSF und TNF-alpha, primitive hämatopoietische Zellen in Kultur

unterstützen können. (26) Es folgten weitere Studien, welche sogar in vivo die Wechselwirkung zwischen HSPCs und Osteoblasten aufzeigen konnten. (27, 28) Beispielsweise demonstrierten Calvi et al. 2003 in ihrem Versuch, dass Osteoblasten mit erhöhter Expression von PTH-Rezeptoren multiple regulatorische Moleküle exprimieren. (27) Im Jahr 2006 gab die International Society for Cellular Therapy eine Erklärung heraus, die folgende Kriterien für humane MSCs definieren: Plastikadhärenz unter speziellen Kulturbedingungen, Expression sowie Fehlen bestimmter Oberflächenmarker und Differenzierung in Bindegewebszellen in vitro. (25)

PERIVASKULÄRE STROMAZELLEN

Perivaskuläre Stromazellen (PVCs), auch als Perizyten bezeichnet, liegen an der Adventitia, der Außenwand kleiner Blutgefäße, an und befinden sich so in direkter Nachbarschaft zu Endothelzellen. (15) Unter Kulturbedingungen verhalten sie sich wie multipotente Vorläuferzellen und weisen Eigenschaften von MSCs auf. Außerdem exprimieren manche humane PVCs und MSCs das gleiche endotheliale Antigen, CD146. (29) In vivo Studien konnten zeigen, dass von Mäusen gewonnene PVCs durch Expression verschiedener Marker wie dem Chemokin CXCL12, (30) dem Leptin-Rezeptor (LEPR) (18, 20) oder dem intrazellulär gelegenen Intermediärfilament Nestin (14, 18-20) gekennzeichnet sind und in Abhängigkeit dazu unterschiedliche Funktionen in der SCN erfüllen. Es scheint, dass ein Teil der MSCs perivaskulären Ursprungs ist. Doch nicht alle MSCs sind PVCs; eine evolutionäre Adaptation wird als Grund für die unterschiedlichen Quellen angenommen, welche eine schnelle Geweberegeneration auf Stammzellbasis gewährleisten soll. (31)

ENDOTHELZELLEN

Endothelzellen (ECs) zählen wie die PVCs zu den wichtigen Komponenten der SCN. (15) Die Tatsache, dass bei extramedullärer Hämatopoese, wie sie unter bestimmten Umständen in Leber und Nieren stattfinden kann, keine Osteoblasten zugegen sind, veranlasste 2005 Kiel et al. dazu, den Blick auf die ECs zu richten. Mithilfe der Identifikation der SLAM-family Rezeptoren stellten sie fest, dass sich

etwa 60% der HSCs aus dem Knochenmark und ca. 62% der extramedullären HSCs in der Nähe der ECs befanden. (32) Trotz der funktionellen Wichtigkeit der Osteoblasten (27, 28) waren weit mehr HSCs mit ECs der Sinusoide als mit Osteoblasten assoziiert. Dies führte zum Schluss, dass auch die ECs hämatopoietische Zytokine exprimieren und dass neben der endostealen eine perivaskuläre Nische existieren muss.

SYMPATHISCHE NERVENFASERN

Sympathische Nervenfasern wirken über die circadiane Freisetzung noradrenerger Signale auf bestimmte Nestin-positive PVCs (Nestin^{bright}) hemmend, indem sie zur Downregulierung des Chemokins CXCL12 führen. (23) CXCL12 wird auch als stromal cell derived factor 1 (SDF-1) bezeichnet und dient dem Chemokin-Receptor (CXCR-4) der HSCs als Ligand. In Konsequenz dazu verharren die HSCs nicht mehr in der G0-Phase, sondern treten in den Zellzyklus über und weiter in den Blutkreislauf ein. Eine der ersten Arbeiten dazu lieferten 2006 die Ergebnisse des Forschungsteams rund um Katayama. (23) Das Team konnte in vivo nachweisen, dass bei Mäusen mit atypischer Nervenleitung nach einer Verabreichung von G-CSF praktisch kein HSPC-Austritt aus dem Knochenmark zu verzeichnen ist. Etwa 5 Jahre später wiesen Yamazaki et al. nach, dass auch nicht-myelinisierten Schwanzzellen durch Aktivierung von latentem TGF-beta eine wichtige Rolle in der SCN einnehmen. (24)

1.1.3.2 HÄMATOPOIETISCHE STAMM- UND PROGENITORZELLEN

Verschiedene in- und extrinsische Faktoren bestimmen das Schicksal der Stammzellen. (5, 7) Die Intrinsischen werden über spezifische Signalkaskaden innerhalb der Zelle gesteuert. Diese Kaskaden wiederum werden durch extrinsische Einflüsse in Gang gesetzt. (5) Zu den Erstgenannten zählt z.B. SOX2, einer der Hauptpluripotenzfaktoren. (33) Bei SOX2 handelt es sich um das Gensymbol für Sex determining region Y box 2. Dieses Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 lokalisiert und stellt einen Transkriptionsfaktor dar.

Gemeinsam mit anderen Faktoren formt es einen Komplex, welcher auf DNA-Ebene die Expression stammzellspezifischer Gene kontrolliert. Außerdem wird eine

Überexpression an SOX2 mit Tumoren wie z.B. dem Lungen- und Speiseröhren-Plattenepithelkarzinom assoziiert. (34) Aber auch Zytokine wie z.B. G-CSF (35) und EPO (36) spielen eine wichtige Rolle in der Hämatopoese, indem sie Self-renewal induzieren, oder die Differenzierungskaskade der HSCs in Gang setzen und zu ihrer Rekrutierung ins periphere Blut führen.

Im adulten Knochenmark wird ein Teil der HSCs in einem Ruhezustand (Quiescence) vorgefunden. Diese Zellen befinden sich in der G0-Phase des Zellzyklus und sorgen für die Aufrechterhaltung (=Maintenance) der HSCs. Hierfür wird den PVCs und ECs (Kapitel 2.1.3.1) eine zentrale Rolle zugeschrieben: quiescente HSCs halten sich in der endostealen Nische in der Nähe zu den Nestin^{bright} Zellen und ECs der Arteriolen auf, da diese eine wichtige CXCL12-Quelle für die HSC-Maintenance darstellen. (14) Ding et al. konnten 2012 aufzeigen, dass CXCL12-defiziente Mäuse perinatal an einer schweren Anämie verstarben. (18) Interessanterweise wurde die HSC-Frequenz und -Funktion nur dann in Mitleidenschaft gezogen, wenn CXCL12 von ECs oder LEPR-exprimierenden PVCs gelöscht wurde, nicht aber wenn Osteoblasten oder gewisse Subpopulationen der Nestin-positiven Zellen (Nestin-Cre, Nestin-CreER) betroffen waren. (18-20) Somit ist für die Quiescence der HSCs die CXCL12-Produktion der ECs und eines bestimmten Teils der PVCs (LEPR-exprimierenden PVCs und Nestin^{bright} Zellen) von Bedeutung. Kunisaki et al. wiesen 2013 nach, dass arterielle Nischen für die Aufrechterhaltung des quieszenten SC-Pools unverzichtbar sind. (14) Die kleinen Arteriolen, welche vorzugsweise im endostealen Knochenmark aufzufinden sind, werden exklusive von Nestin^{bright} Zellen umhüllt und sind signifikant mit ruhenden HSCs assoziiert, wobei kein direkter Kontakt notwendig zu sein scheint. In der endostealen Nische residieren neben Perivaskulären Stroma- und Gefäßzellen auch Subpopulationen der Knochenzelllinie. Hier stehen die HSCs mit einer spezialisierten Art von Osteoblasten, den SNO Zellen, in Kontakt. (28) Während PVCs und ECs durch Sekretion verschiedener Zytokine wie CXCL12 (14, 18-20) und Angiopoetin-1 (Ang-1) (22, 37) Einfluss auf die Quiescence der Stammzellen nehmen, wird den Osteoblasten eine indirekte Wirkung zugeschrieben. (38) In vivo Bildgebungsstudien, wie sie von Kiel et al. und Lo Celso et al. (39) durchgeführt wurden, demonstrierten, dass nur ein geringer Anteil der HSCs in Kontakt mit Osteoblasten steht. Dass es sich bei diesen HSCs um ruhende SCs handelt, welche

den TPO-Rezeptor exprimieren und eng mit TPO-produzierenden Osteoblasten assoziiert sind, konnten Yoshihara et al. in ihrer Arbeit zeigen. (40) Der TPO-MPL-Signalweg soll dabei bestimmte Integrine und Kinase-Inhibitoren hochregulieren, so dass die HSCs in der G0-Phase verharren. Interessanterweise induzierte exogenes TPO nach vorübergehender Quiescence eine verstärkte HSC-Proliferation in vivo. Neben verschiedenen Zytokinen wird auch bestimmten Adhäsionsmolekülen wie den Integrinen eine wichtige Rolle für die Quiescence der HSCs zugeschrieben. So sind z.B. die VLA-4-Interaktion mit VCAM (41) oder die β 3-Signalisierung für eine ruhende SC-Population verantwortlich. (42) Aber auch dem Nervensystem, im Genaueren den nicht-myelinisierten Schwanzellen, wird über die Aktivierung von latentem TGF-beta eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Quiescence nachgesagt. (24)

Verschiedene Forschungsteams, wie jene rund um Butler et al., (21) Kobayashi et al. (22) und Kunisaki et al., (14) konnten zeigen, dass die Interaktion der HSCs mit stromalen und vaskulären Zellen nicht nur für die Maintenance der ruhenden HSCs von Bedeutung ist. Auch für die Selbsterneuerung der Stammzellen (Self-renewal) sind die PVCs und ECs der vaskulären Nische (Kapitel 2.1.3.1) von essentieller Bedeutung. Während sich ruhende HSCs in der endostealen Nische nahe der Arteriolen und Nestin^{brigh} Zellen aufhalten, ordnen sich aktivierte HSCs in der Nähe zur sinusförmigen Region und zu Nestin^{dim} Zellen an. (14) Diese HSCs treten aus der G0-Phase in die Synthesephase des Zellzyklus ein, entweder um Self-renewal zu betreiben und so für die Expansion des SC-Pools zu sorgen, oder um sich weiter zu Vorläuferzellen und letztlich zu spezialisierten hämatopoietischer Zellen zu differenzieren. Die Expression angiogener Faktoren wie z.B. SCF, (14, 15, 19) Jagged-1 (21) und BMP-4 (22) unterstützt hierbei das Self-renewal der HSCs. Während PVCs und ECs durch Bereitstellung verschiedener Zytokine die Expansion der HSCs unterstützen, scheinen die Vorläuferzellen der Osteoblasten, nicht aber die mineralisierenden Osteoblasten, einen Effekt auf die Proliferation der HSCs, (43) genauer gesagt auf die Spezialisierung zu Progenitorzellen der B-Zellreihe, (20) zu haben.

Bei der hämatopoietischen Differenzierung handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, in welchen verschiedene Zytokine eingreifen und zur Spezialisierung der HPCs führen. So fördert z.B. das Interleukin IL-7 die Lymphopoese, (44) während die Wachstumsfaktoren GM-CSF, G-CSF und M-CSF die Differenzierung der myeloischen Progenitorzellen zu Granulo- und Monozyten unterstützen. (45) Einen weiteren wichtigen Faktor stellt Erythropoetin (EPO) dar.

EPO ist ein Glykoprotein, welches die Bildung der Erythrozyten aus den Vorläuferzellen (Erythropoese) steuert. (46) Als Antwort auf Hypoxie stellen die Nieren vermehrt EPO her, um in weiterer Folge über mehrere Differenzierungsstufen hinweg zu einem Anstieg der Erythrozyten und letztlich zu einer Erhöhung Sauerstoffkonzentration im Blut zu führen. Die unreifste Form der Progenitorzellen stellt die burst forming unit-erythroid (BFU-E) dar. (46) Die BFU-E (human) ist dadurch definiert, dass sie in Kultur innerhalb von 2-3 Wochen Kolonien von Hunderten bis Tausenden Erythroblasten bildet. Die BFU-E wird von der colony forming unit-erythroid (CFU-E) gefolgt. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass sie sich in Kultur innerhalb von einer Woche in eine Kolonie von 8 bis 64 Erythroblasten (human) differenziert. Im Knochenmark machen die CFU-E weniger als 0,5% und die BFU-E sogar weniger als 0,1% der Gesamtzellzahl aus. (46) Aus den Stufen des Erythroblasten (Proerythroblast, basophile, poly- und orthochromatische Erythroblast) entwickeln sich die Retikulozyten, welche in den Blutkreislauf austreten. (47) Um den täglichen Bedarf an roten Blutzellen zu decken, muss das Knochenmark etwa 2,5 Millionen Erythrozyten pro Sekunde produzieren. (47) Interessanterweise finden sich die Oberflächenmarker für EPO nicht nur auf den roten Blutzellen, sondern auch auf Megakaryozyten, Lymphozyten und Endothelzellen. (46) Neben dem EPO wird auch dem Kortisol und dem SCF eine wichtige Rolle bei der Erythropoese zugeschrieben. (48) Grover et al. konnten 2014 in ihrer Studie nachweisen, dass erhöhte systemische EPO-Level nicht nur auf die erythrozytäre Zelllinie eine Auswirkung haben. (36) Hierfür wurde in 8-12 Wochen alten Mäusen ein CMV-basierender EPO-Expressions-Vektor injiziert. Um den Effekt auf die Vorläuferzellen zu untersuchen, wurde zwei Tage nach der Injektion das Knochenmark isoliert. Die HSPCs wurden unter verschiedenen Bedingungen für acht Tage kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen, welche spezifisch auf die jeweiligen Zelllinien ausgerichtet waren, führten zu keiner signifikanten

Veränderung hinsichtlich der CFU-E, sehr wohl aber zu einem Abfall der CFU-Mk-, -GM- und -B-Kolonien. Interessanterweise kam es aber unter den Kulturbedingungen, welche sowohl für die erythrozytäre als auch auf die myeloide Zelllinie ausgelegt waren, neben einer Erniedrigung der Gesamtkolonien-Anzahl zu einer relativen Erhöhung der erythrozytären Kolonien. Grover et al. schlossen daraus, hohe systemische EPO-Level zu einer Re-Programmierung der HSPCs auf mRNA-Ebene in vivo führen und so zu einem Anstieg der erythrozytären HSCs bei Abfall der nicht-erythrozytären HSCs.

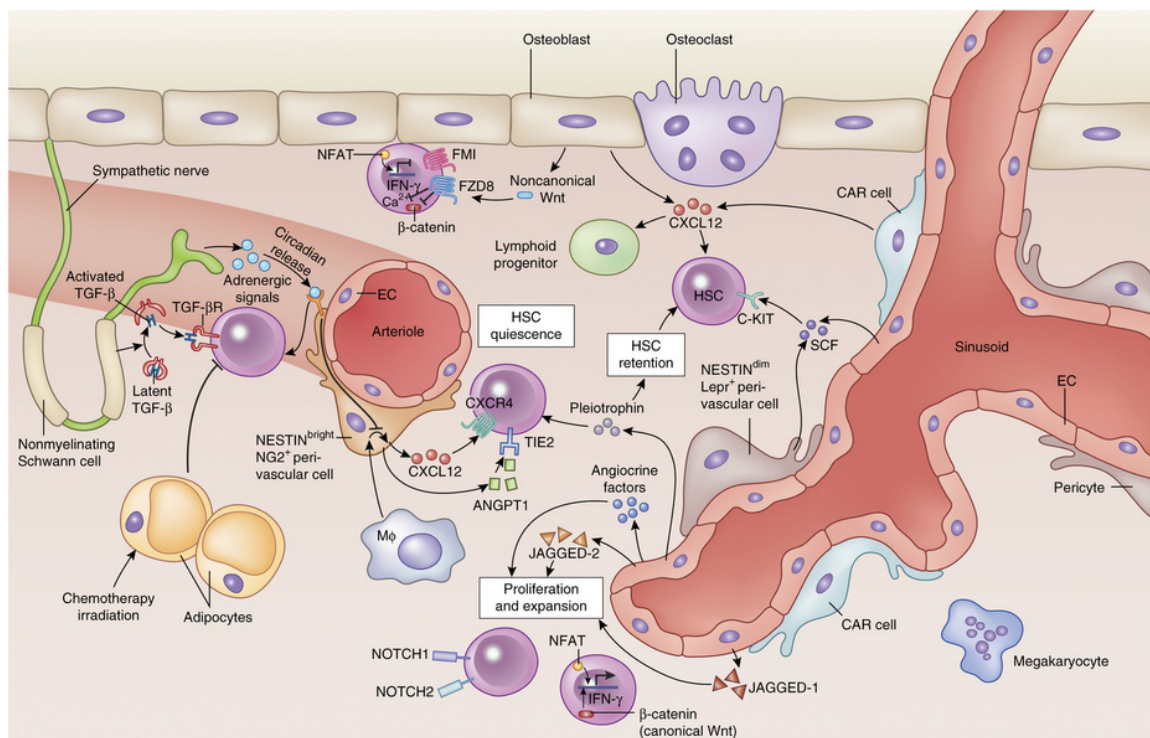


Abbildung 3: Stammzellnische (Quelle: Nat Med. 2014 Aug; 20(8): 833–846 (15))

Indem die hämatopoietische Zelle allmählich ihren Kontakt zu den Nischenzellen verliert, wird sie aktiv, proliferiert und befindet sich in der sinusoidalen Region. Von dort aus wandert sie in ein Blutgefäß ein und tritt aus dem KM aus. Unter Mobilisierung versteht man ein gezieltes Austreten der HSPCs aus dem KM in die Peripherie. Umgekehrt bezeichnet man als Homing ein gezieltes Einwandern der HSPCs aus dem Peripherieblut ins KM. Innerhalb eines Zeitraums von ein bis zwei Tagen wandern sie zurück in ihre physiologische Nische und aktivieren ihre Adhäsionsrezeptoren, um wieder in Kontakt mit den anderen Nischenzellen zu

treten. Das Homing der HSPCs findet vorzugsweise in trabekelreichen Metaphysen statt. (49) Mittels Mikro-Computertomographie konnten Ellis et al. 2011 nachweisen, dass HSPCs das Endothel der Sinusoide überqueren und sich anschließend ~71% der einwandernden Zellen außerhalb der Gefäße innerhalb des trabekelreichen Knochenmarks aufhalten. Als der Prototyp der Mobilisierungs-Zytokine gilt der Wachstumsfaktor G-CSF. Der Prozess der induzierten Mobilisierung wird teils durch die Trennung (Cleavage) der Verbindung zwischen CXCR-4 und CXCL12 vermittelt. Dabei wirkt G-CSF inhibierend auf die Genexpression von CXCL12, ein überwiegend von PVCs sezerniertes Chemokin. CXCL12, auch als SDF-1 bezeichnet, ist als Ligand des CXCR-4 auf HSCs für deren Bindung in der SCN verantwortlich. Infolge der verminderten CXCL12-Expression und der gestörten Bindung proliferieren und wandern die HSPCs Richtung Sinusoide ab, von wo sie aus der Stammzellnische ins periphere Blut austreten. (50) Diese Effekte von G-CSF werden in der Medizin genutzt, um ein stammzellreiches Apheresat zu erhalten. Zur Erhöhung der Ausbeute an PBSCs und zur schnelleren Durchführung der Apherese kann ein CXCR4-Antagonist, Plerixafor (AMD3100), zugesetzt werden. Plerixafor führt durch die reversible Bindung am CXCR-4 zu einem Cleavage-Effekt. Durch G-CSF und Plerixafor mobilisierte PBSCs unterscheiden sich hinsichtlich ihres intrinsischen Charakters. Fruehauf et al. konnten 2009 in ihren Studien zeigen, dass sich ein größerer Anteil der Plerixafor-mobilisierten PBSCs in der G1-Phase des Zellzyklus befindet und somit primitivere Eigenschaften als durch G-CSF-mobilisierte PBSCs aufweist. (35) Katayama et al. konnten 2006 zeigen, dass das sympathische Nervensystem eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung von HSPCs spielt. (23) Myelinscheiden-defiziente Mäuse wiesen infolge atypischer Nervenleitung praktisch keinen HSPCs-Austritt aus dem Knochenmark nach G-CSF-Verabreichung auf. Im Vergleich dazu kam es bei den Kontrollmäusen neben Mobilisation zusätzlich zur Suppression der Osteoblasten und reduzierter Knochenbildung. Auch die adrenerge Stimulation scheint eine regulierende Wirkung auf die Mobilisierung und Osteoblasten zu haben.

1.1.4 KULTIVIERUNG DER STAMMZELLEN

1.1.4.1 GEWINNUNG DER STAMMZELLEN

Während man adulte hämatopoietische Stammzellen aus dem Knochenmark, dem peripheren Blut oder aus Nabelschnurblut erhält, werden embryonale aus Blastozysten oder iPS (induziert pluripotente Stammzellen) gewonnen. Aus fünf bis sechs Tage alten Blastozysten können durch In-vitro-Fertilisation, Parthenogenese oder durch Klonierung embryonale Stammzellen erzeugt werden. (51, 52) In-vitro-Fertilisation stellt eine Methode der Reproduktionsmedizin zur künstlichen Befruchtung dar, um bei ungewollter Kinderlosigkeit eine Schwangerschaft herbeizuführen. Im Reagenzglas werden Eizelle und Spermium zusammengeführt, damit eine Zygote entstehen kann. Der Trophoblast, aus welchem sich der kindliche Anteil der Plazenta bilden würde, wird unter Anwendung von Laserstrahlen oder Antikörpern zerstört. Schließlich erhält man nach Kultivierung der Inneren Zellmasse Embryonale Stammzellen. Unter Parthenogenese („Jungfernzeugung“) versteht man ein Verfahren zur künstlichen Erzeugung von Embryonen aus unbefruchteten Eizellen. (52) Mechanische, chemische und elektrische Reize regen die Oozyte zur Teilung an. Auch wenn natürliche Parthenogenese bei manchen Lebewesen beobachtet wird, so findet sie nicht bei Säugetieren statt. Die Gewinnung embryonaler Stammzellen durch Klonen wird auch als Zellkerntransfer bezeichnet und ist eine Methode, bei welcher der Zellkern einer Körperzelle in eine entkernte Eizelle transferiert wird. Infolge nicht gänzlich verstandener Prozesse kommt es zum Verlust der Zellspezialisierung. Nach Aktivierung durch beispielsweise Strom beginnt sich die Eizelle zu teilen und sich zur Blastozyste zu entwickeln. Stammzellen aus Partheno- oder Klon-Embryonen unterscheiden sich wahrscheinlich im Hinblick auf ihre Immunverträglichkeit von den in vitro befruchteten, da bei ihnen nicht so starke Abstoßungsreaktionen zu erwarten sind. Allerdings sind diese Methoden mit hohen Missbildungs- und Sterblichkeitsraten verbunden. Die Zell-Reprogrammierung ist ein Verfahren, durch welches Genmaterial in eine adulte Zelle eingeschleust wird, so dass diese Eigenschaften einer Embryonalen Stammzelle erhält (iPS). (7) Man erhofft sich so, das Forschen

mit Oozyten und Zerstören von Embryonen sowie den damit einhergehenden ethischen Konflikten umgehen zu können.

Durch Gabe von G-CSF bzw. CXCR4-Antagonisten und mit Hilfe der Apherese können HSPCs auch aus dem zirkulierenden Blut isoliert werden. Für die Gewinnung von Stammzellen aus dem Knochenmark wird unter Anästhesie der Beckenkamm punktiert und die HSPCs aus dem Knochenmark aspiriert. (53) Die technisch einfachere Methode stellt die Gewinnung von HSCs aus dem Nabelschnurblut dar. Hierfür kann unmittelbar nach der Geburt aus der Vena umbilicalis Zellmaterial gewonnen werden. Dieses kann zuerst aufbereitet werden, das bedeutet, dass die Stammzellen von den restlichen Blutkomponenten getrennt werden können. Zunächst werden sie mithilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation, einem physikalischen Trennverfahren, vorab isoliert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung: anhand ihrer unterschiedlichen Oberflächenantigene werden die Zellen magnetisch (MACS) oder durchflusszytometrisch (FACS) voneinander getrennt. Als Marker für die hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen dient CD34. (54)

1.1.4.2 KRYOKONSERVIERUNG UND EXPANSION DER HSPCs

Zunächst wird den Zellen eine Gefrierschutzlösung zur Unterbindung der Kristallbildung zugesetzt. Weltweit am meisten verbreitet ist Dimethylsulfoxid (DMSO). Bevor die Stammzellen kontrolliert tiefgefroren werden, erfolgt eine Abkühlung auf $+4^{\circ}\text{C}$. (55) Anschließend kommt das Präparat in den Einfrierautomaten mit Temperaturen zwischen -80°C und -196°C . Grundsätzlich gibt es zwei Lagerungsarten im Stickstofftank: die in der flüssigen oder die in der gasförmigen Phase. Da man bei der Kryokonservierung in flüssigen Stickstoff Kontaminationen mit Pilzen feststellte, wird aktuell die Lagerung in der Gasphase bei Endtemperaturen von -156°C empfohlen. (55) Zu den wichtigen Faktoren einer adäquaten Kryokonservierung gehört außerdem eine optimale Geschwindigkeit der Abkühlung, da es ansonsten infolge von Kristallbildung zur Zellschädigung kommen kann. Für das Auftauen der Präparate stehen Wasserbad oder Automaten zur Verfügung. Im Falle der Automaten befindet sich das Zellmaterial zwischen Gelkissen, welche mit 37°C heißen Wasser gefüllt sind. Diese Technik weist im

Vergleich zu Wasserbädern eine geringere Kontamination auf. Auch hier spielt die optimale Geschwindigkeit des Erwärmens eine Rolle. Generell werden die Stammzellen im Gegensatz zum langsamen Prozess des Einfrierens relativ schnell aufgetaut.

Herkömmliche Kultivierungsverfahren finden in statischen Systemen wie den Kulturschalen statt. In den letzten Jahren entstanden komplexere Modelle wie der Teflonbeutel, dessen Wände für eine Sauerstoffversorgung der Zellen gaspermeabel sind. Unterschieden werden zwei Kultivierungstechniken: die stromhaltige und die stromfreie. Die technisch einfachere Methode stellt letztere dar, da hier lediglich durch Zugabe von löslichen Zytokinen das Zellschicksal reguliert wird. Weltweit sind Forscherinnen und Forscher auf der Suche nach Methoden für eine ausreichende Expansion der HSPCs. Studien über stromhaltige Kultivierungstechniken wiesen darauf hin, dass es unter MSC- (56) oder EC-Co-Kultivierung (22) zu einer signifikanten Erhöhung der Stamm- und Vorläuferzellen kommt. So soll z.B. die Verwendung von frisch isolierten MSCs die während der Langzeitkultivierung vorkommenden zellintrinsischen Veränderungen wie Seneszenz minimieren. (56) Unter den heterogenen Subpopulationen der MSCs weisen die aus dem KM gewonnenen Zellen bessere Ergebnisse als die aus dem Fettgewebe auf. (57) Auch der Zusatz bestimmter Zytokine wie SCF und TPO führte zu einer verstärkten Expansion der HSPCs. 2008 entwickelten Zhang und Kollegen/-innen durch Untersuchung eines Mediums aus verschiedenen Wachstumsfaktoren wie SCF, TPO, FGF-1, ANGPTL-5 und IGFBP2 eine Methode zur Optimierung der Zellkultivierung. (58) Auch Fan et al. schafften 2014 über mehrere Verdünnungsstufen hinweg einen Ansatz zur verbesserten in vitro Expansion. (59) Kürzlich entdeckten Bari et al. die potente Wirkung eines Moleküls, C7. (60) In ihrer 2018 veröffentlichten Studie konnten sie zeigen, dass C7 im Vergleich zur Zytokin-Kontrollgruppe eine signifikant stärkere HPC-Expansion hervorrief.

1.2 NABELSCHNURBLUT

Die Anfänge der Stammzelltransplantation gehen auf die Fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts zurück, als der amerikanische Arzt E. D. Thomas die erste Knochenmarkstransplantation (BMT) an eineiigen Zwillingen wagte. Fast dreißig weitere Jahre benötigte es, um den Weg von der ersten BMT bis zur ersten Nabelschnurtransplantation (CBT) zu gehen: 1988 führte die französische Ärztin E. Gluckmann erstmals eine Transplantation mit aus Nabelschnurblut gewonnenen HSCs an einem unter Fanconi-Anämie leidenden Kind durch. (61) Bis zu diesem Zeitpunkt, wurde das Nabelschnurblut, nach dem es seine neunmonatige Funktion erfüllt hatte, gemeinsam mit der Plazenta entsorgt. Doch gerade das Nabelschnurblut stellt eine kostbare Stammzellquelle dar. Die Vorteile bestehen darin, dass es sich um noch sehr junge Zellen handelt, die somit immunologische Unreife aufweisen. (62) So muss der HLA-Typus zwischen Spender/-innen und Empfänger/-innen nicht in allen Allelen übereinstimmen. Seltener werden Abstoßungsreaktionen oder Komplikationen wie Graft-versus-Host-Disease (GvHD), einer immunologischen Reaktion, bei welcher Zellen des Transplantats gegen Zellen des Empfängerorganismus reagieren, beobachtet. (63) Vor allem ethnische Minderheiten können aufgrund ihres spezifischen HLA-Musters davon profitieren. (64) Weitere Vorteile stellen ihre risikolose Entnahme und ethische Akzeptanz dar. Nachteilig dagegen ist die begrenzte Menge an Material, welche vor allem bei erwachsenen Patienten/-innen einen limitierenden Faktor darstellt und in ein verzögertes Engraftment resultiert. (63, 65) Im Falle einer Aufbewahrung in Nabelschnurbanken kommen zusätzlich die Kosten ins Spiel. Mittlerweile verabreicht man zwei Nabelschnurtransplantate gleichzeitig (Poolen von UCB), um den limitierenden Faktor der ungenügenden Zellmenge auszugleichen. (66, 67) Weltweit existieren über 100 öffentliche Nabelschnurbanken mit ca. 600.000 HLA-typisierten Nabelschnurspenden. Die Einlagerung der ca. 780.000 Eigenspenden wird weltweit von über 130 privaten Banken angeboten. (68) Allerdings sind diese nicht HLA-typisiert und kommen so nicht für andere Patienten/-innen in Frage.

1.2.1 NABELSCHNURBLUTTRANSPLANTATION

Seit der ersten erfolgreichen Knochenmarkstransplantation behandelt man Blutkrankheiten wie Leukämien oder Fanconi-Anämien mit Stammzellen, die aus dem Knochenmark direkt oder durch Mobilisation in die Peripherie und Apherese gewonnen werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Isolierung aus der Nabelschnur dar. Unterschieden werden Verwandten- und Fremdspenden. (69) Während bei der Geschwisterspende die Chance einer vollständigen HLA-Kompatibilität 25% beträgt, besteht eine durchschnittliche Wahrscheinlichkeit von etwa 1:500.000, dass zwei Nichtverwandte miteinander kompatibel sind. (70) Der Erfolg einer HCT basiert auf drei wesentlichen Punkten: 1. Passende/r Spender/-in, 2. Prävention bzw. Behandlung der transplantationsassoziierten Komplikationen und 3. Nachhaltige Eliminierung der Krankheit. Aufgrund der geringen Zellmenge wurden CBT lange Zeit nur bei Kindern angewandt. Erst durch neue Kultivierungstechniken (58, 59) und doppelten Nabelschnurtransplantaten (Poolen von UCBs) eröffneten sich neue Perspektiven für adulte Patienten/-innen. (66, 67)

Die ersten großen Studien wurden Ende des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Eurocord veröffentlichte 1997 die Ergebnisse von 143 mit UCB-HSCs behandelten Patienten/-innen. (71) Die Auswertungen der CBT, welche im Zeitraum von Oktober 1988 bis Dezember 1996 durchgeführt wurden, verglichen Engraftment, GvHD, Rückfall- und Überlebensrate der Kinder miteinander. Hierfür wurden die Patienten/-innen in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine bestand aus 78 Patienten/-innen, welche vorwiegend Geschwisterspenden (in 76 Fällen) oder auch Spenden von anderen verwandten Angehörigen erhalten hatten (verwandte/r Spender/-in: related donor, RD; unverwandte/r Spender/-in: unrelated donor, UD;). Aus dieser Gruppe erhielten 60 der Kinder ein HLA-identisches Transplantat. Die zweite bestand aus 65 Kinder, welche in keinem Verwandtschaftsverhältnis zu ihrem/r Spender/-in standen (UD). Von ihnen erhielten 9 ein HLA-identisches und 56 ein mismatched Transplantat, wobei davon fast 77% nur in einem HLA-Antigen nicht übereinstimmten. Insgesamt litten 95 der Patienten/-innen an einer malignen hämatologischen Erkrankung. An Leukämie waren 79 Patienten/-innen erkrankt: 40 an ALL (24 der RD, 16 der UD;), 22 an AML (8 der RD, 14 der UD;) und 17 an CML (6 RD, 11 UD;). Als Engraftment

galt u.a. eine Erholung der neutrophilen Zellen auf mind. 500 Zellen/ μ l Blut in drei aufeinander folgenden Tagen innerhalb der ersten 30 Tage nach der Transplantation. Das traf auf ca. 83% der Kinder zu: 79% der Gruppe mit Spenden aus dem Verwandtenkreis und 87% der Gruppe mit Fremdspenden. Zur akuten GvHD kam es bei 14 Patienten/-innen (~18%) der RD- und bei 21 (~32%) der UD-Gruppe. In 8 Fällen (~10%) der RD- und in keinem der UD-Gruppe tauchte eine chronische GvHD auf. Zum Rückfall kam es bei 22 der 95 Kindern, die an einer malignen Krankheit erkrankt waren. Darunter befanden sich 17 der 79 Leukämiepatienten/-innen: 10 der RD- (~26%) und 7 (~17%) der UD-Gruppe. Insgesamt überlebten von den 143 Kindern fast die Hälfte das erste Jahr: 63% der Patienten/-innen mit Verwandten- und 29% der Patienten/-innen mit Fremdspenden. Zu den Faktoren, die sich positiv auf das Überleben (overall survival, OS;) auswirkten, zählten ein Alter unter 6 Jahren, ein Gewicht unter 20 kg und eine negative CMV-Serologie. Wobei ein HLA-match den wichtigsten Faktor der GvHD bzw. der OS darstellt. (71)

Im Jahr 2000 veröffentlichten Rocha et al. eine Studie, in welcher Ergebnisse der CBT mit denen der BMT verglichen wurden. (63) Die Daten der 2165 transplantierten Kindern stammten von der Euro-Cord Blood Transplant Group und dem International Bone Marrow Transplant Registry. Etwa 5% der Kinder wurden mit UCB-HSCs HLA-identer Geschwistern behandelt. Die restlichen 2052 Patienten/-innen erhielten Stammzellen aus dem BM, ebenfalls von HLA identen Geschwistern. Die CBT-Gruppe wies ein medianes Alter von 5 Jahren und ein medianes Gewicht von 17 kg auf. Das mediane Alter und Gewicht der BMT-Gruppe betrug 8 Jahre und 26 kg. Auch in dieser Studie litt der Großteil der Kinder an einer malignen hämatopoietischen Erkrankung. Fast 42% der CBT- und ca. 53% der BMT-Gruppe waren an Leukämie erkrankt. Als Engraftment wurde ebenfalls eine Erholung der neutrophilen Zellen auf mind. 500/ μ l Blut in drei aufeinander folgenden Tagen erachtet. Bei den mit UCB transplantierten Kindern wurde ein medianes Engraftment von 26 Tagen und bei der BMT-Gruppe von 18 Tagen verzeichnet. In der CBT-Gruppe kam es bei 14% und in der BMT-Gruppe bei 24% der Kinder zu einer akuten GvHD. Von denjenigen, welche die ersten 90 Tagen überlebten (CBT: 93 Kinder, BMT: 1179 Kinder) erlitten 5% der CBT- und 14% der BMT-Gruppe eine chronische GvHD. Innerhalb des ersten Jahres verstarben 14% der CBT- und 12%

der BMT-Gruppe. In beiden Fällen galt als Hauptursache eine Persistenz oder ein Rückfall der malignen Erkrankung. Zusammenfassend wiesen die mit UCB behandelten Patienten/-innen eine geringere Inzidenz der GvHD auf, während die mit BM therapierten Patienten/-innen durch ein schnelleres Engraftment gekennzeichnet waren. Bezüglich Überlebensrate unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant voneinander. (63)

Anfang des neuen Jahrhunderts veröffentlichte man auch Studien zu adulten mit UCB behandelten Patienten/-innen. Rocha et al. verglichen 2004 die Ergebnisse von 682 Patienten/-innen, die in zwei Gruppen aufgeteilt wurden und deren Transplantationen im Zeitraum von Jänner 1988 bis Dezember 2002 durchgeführt wurden. (65) Die Daten stammten von Euro-Cord und von Euro Blood and Marrow Transplant Group. Etwa 14% der Patienten/-innen erhielten CBT, während die restlichen 584 mit BMT behandelt wurden. In der BMT-Gruppe stimmten alle HLA Merkmale überein und sie war durch ein medianes Alter von 32 Jahren und ein medianes Gewicht von 68 kg gekennzeichnet. In der CBT-Gruppe waren 6% HLA-ident und sie wies ein medianes Alter von 24,5 Jahren und ein medianes Gewicht von 58 kg auf. Auch in dieser Studie galt als Engraftment u.a. eine Erholung der Neutrophilen auf eine Anzahl von mind. 500 Zellen/ μ l Blut in drei aufeinander folgenden Tagen. Das mediane Engraftment nahm bei den mit UCB transplantierten Patienten/-innen 26 Tage und bei den mit BM transplantierten Patienten/-innen 19 Tage in Anspruch. Ein fehlgeschlagenes Engraftment (GF) wurde durch ein Ausbleiben der Neutrophilenerholung für 60 Tage nach der Transplantation definiert. Ein GF tauchte zu 20% in der CBT- und zu 7% in der BMT-Gruppe auf. In 26% der CBT- Patienten/-innen kam es zu einer akuten GvHD bzw. in 20% zu einer chronischen GvHD. In der BMT-Gruppe kam es in 39% der Fälle zu einer akuten bzw. in 46% zu einer chronischen GvHD. Keine signifikanten Unterschiede wurden bezüglich OS der ersten zwei Jahre, DFS (disease-free survival) und Relapse (R) verzeichnet: OS CBT: 36% vs. OS BMT: 42%; DFS CBT: 33% vs. DFS BMT: 38%; R CBT: 23% vs. R BMT 23%. Wie bei den Ergebnissen der pädiatrischen Studien kam es bei der adulten CBT-Gruppe seltener zu GvHD und bei der adulten BMT-Gruppe zu einem schnelleren Engraftment. (65)

Wenige Jahre darauf kam eine Meta-Analyse über an Kinder sowie an Erwachsenen durchgeführte CBT und BMT heraus. (72) Hwang et al. schlossen in ihrer Analyse verschiedene Studien mit ein, welche voneinander unabhängig waren. Außerdem kamen nur jene in Frage, welche in ihren Untersuchungen als Hauptzielgröße die Überlebensrate der Patienten/-innen definierten und in zweiter Linie auch das Engraftment, GvHD, Relapse und TRM mituntersuchten. Von den verschiedenen Quellen wie Pubmed database und diversen Journals wurden schließlich mehrere Publikationen in die Studie miteinbezogen. (65, 73-76) Es wurden insgesamt die Daten von 477 adulten und pädiatrischen Patienten/-innen, die CBT erhalten hatten, sowie von 1312 adulten und pädiatrischen Patienten/-innen, die mit BMT therapiert wurden, ausgewertet. Hwang et al. kamen zu dem Entschluss, dass die Kinder-Gruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich OS und Rückfall aufwies. Auch hier fiel das Engraftment zugunsten der pädiatrischen BMT-Gruppe aus und umgekehrt die GvHD zugunsten der CBT-Gruppe. Genauso wiesen die Erwachsenen keine signifikante Differenz bezüglich OS und Relapse auf. Auch hier zeigte die adulte BMT-Gruppe ein schnelleres Engraftment und die CBT-Gruppe ein geringeres Risiko für GvHD. (72)

Eine andere Studie verglich Engraftment, GvHD, TRM und DFS bei Patienten/-innen, denen eine CBT durch Fremdspenden ermöglicht wurde, mit Patienten/-innen, die BMT oder PBSCT (peripheral blood stem-cell transplant) Dank verwandten Spenden erhalten hatten. (77) Signifikant verspätetes Engraftment wurde bei der CBT-Gruppe beobachtet. Die Inzidenz an akuten GvHD und chronischen GvHD trat vermehrt nach BMT und PBSCT auf. Auch diese Analyse fand unter den verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich TRM und DFS (TRM: 9% bei UCBT, 13% bei UBMT und PBSCT; DFS: 70% in UCBT und 60% in bei UBMT und PBSCT). (77) Eine retrospektive Analyse verglich GvHD, LFS und TRM von UD- CBT, -BMT und -PBSCT miteinander. (78) CBT wies eine geringere Inzidenz für GvHD im Vergleich zu PBSCT und BMT. TRM kam bei CBT- Patienten/-innen öfter als bei den anderen zwei Gruppen vor. Bezüglich LFS waren die Ergebnisse der CBT vergleichbar mit denen der BMT und PBSCT. Alles in allem empfehlen Eapen et al. eine CBT bei erwachsenen Patienten/-innen, die an akuter Leukämie leiden und kein/e HLA-matched Spender/-in vorliegt, obwohl eine Transplantation als dringlich erforderlich eingestuft wird. (78) Wie weit die Allel-

Übereinstimmung Einfluss auf den Verlauf hämatologischer maligner Erkrankungen nimmt, versuchten Eapen et al. mit einer anderen Studie herauszufinden. Vor wenigen Jahren (2014) veröffentlichten sie ihre Analyse über 1568 CBT, von denen 7% eine Allel-Übereinstimmung zu 100% besaßen. (79) Von den restlichen stimmten 5% in 5, 16% in 4, 30% in 3, 26% in 2 und 15% in einem Allel überein. Die mismatched CBT wiesen eine erhöhte NRM (Non-relapse-mortality) auf. Die CBT mit fehlender Übereinstimmung in 3, 4 oder 5 Allelen zeigte eine verlängerte Neutrophilenerholung. (79)

Um den limitierenden Faktor der geringen Stammzellzahl im Falle der UCB zu umgehen, wurde versucht zwei Nabelschnurblut-Einheiten (double UCB, dUCB) gleichzeitig zu transplantieren. Brunstein et al. untersuchten die Ergebnisse von 536 Patienten/-innen, die unter malignen Erkrankungen gelitten und CBT erhalten hatten. (66) Diese wurden auf 4 Gruppen aufgeteilt: RD-Gruppe (38%), HLA-matched UD-Gruppe (MUD, 28%), HLA-mismatched UD-Gruppe (MMUD, 10%) und die dUCB-Gruppe (24%). Die Transplantate der MMUD stimmten in 1 und die der dUCB in 1-2 HLA-Merkmalen nicht überein. In Bezug auf LFS gab es keine signifikanten Unterschiede in den 4 Gruppen. Hinsichtlich Relapse-Risiko und GvHD schnitten die Patienten/-innen, die zwei Nabelschnurblut-Einheiten erhalten hatten, am besten ab. Jedoch wiesen die Empfänger der dUCB gegenüber den anderen hinsichtlich verzögertem Engraftment und NRM schlechtere Ergebnisse auf. (66) Das Team rund um Baron et al. befasste sich in seiner Studie mit CBTs, welche zwischen 2004 und 2014 durchgeführt wurden. (67) Miteinander verglichen wurden 534 double CBTs (dCBTs) und 172 single CBTs (sCBTs). Die Patienten/-innen wurden bezüglich Alter, Zeitraum zwischen Diagnose und Tag der Transplantation sowie hinsichtlich Krankheitsart und Krankheitsstadium gleichmäßig auf die zwei Gruppen aufgeteilt. Baron et al. verzeichneten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Engraftment, Relapse, OS und NRM. Während die sCBT-Gruppe einen Trend in Richtung geringer Inzidenz für akute GvHD aufwies, fiel in der dCBT-Gruppe eine erhöhte mit GvHD assoziierte Sterberate auf (3,5% vs. 1,7%). (67) Alles in allem konnte die Studie keinen besseren Outcome unter Verwendung doppelter Nabelschnurblut-Einheiten verzeichnen.

1.2.2 HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG

In dieser Studie war die Fragestellung dahingehend, ob die Prozesse der Kultivierung Auswirkungen auf die Qualität (Self-renewal und Expansion) der aus Nabelschnurblut isolierten HSPCs, insbesondere der CFU-GM und BFU-E, haben.

Die Hypothese war, dass im Langzeitkulturmodell aus Nabelschnurblut gewonnene HSPCs im Verlauf der Passagierung durch verschiedene Mechanismen in ihrer Zellexpansion (Proliferationskapazität) abnehmen. Mittels in vitro Testungen der CD34+-Zellen, der MNCs und der primären CFUs und BFUs mit EPO sollte die Fragestellung dahingehend beantwortet werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 KULTIVIERUNG DES ZELLMATERIALS

In dieser Arbeit werden die Zellkulturen HSC 15, 16, 17, 19 und 21 behandelt. Jede Woche erfolgte ein Primäransatz der einzelnen HSCs, deren gebildete Kolonien nach 8 Tagen ausgezählt und in einen Sekundäransatz übergeführt wurden. Zuletzt erfolgte in der Regel am Tag 16 die Zählung der sekundären Kolonien. Die einzelnen Schritte wurden über mehrere Passagen hinweg von einem Team, bestehend aus Frau PD. Dr.ⁱⁿ Ingeborg Stelzer, Herrn Univ.-Ass. Mag.rer.nat. Dr.scient.med. Robert Fuchs und den Studierenden Martin Rinofner und Asmira Samardzic, durchgeführt.

2.1.1 GEWINNUNG, ISOLIERUNG UND SEPARIERUNG

Nach Gewährung durch die Ethikkommission Graz (Ethikkommissionsvotum EK-Nummer: 21-197 ex 09/10) und nach Einverständnis der Mütter wurde an der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe mit Hilfe der Study Nurses der Gebärklinik Graz Blut aus der Vena umbilicalis entnommen und mit 5 ml eines Antikoagulans, Acid-Citrat-Dextrose-Lösung A (ACDA), in 50 ml Falcon-Tubes gesammelt. Die Weiterverarbeitung des gewonnenen Materials erfolgte durch die Biomedizinische Analytikerin Elvira Kloibhofer im pädiatrisch-hämatonkologischen Labor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde Graz. Für die Erstellung des Primäransatzes wurde das Vollblut mit einem Puffer verdünnt und mit Ficoll überschichtet. Die anschließende Zentrifugation trennte die mononukleären Zellen (MNCs) und das Plasma von den restlichen Blutbestandteilen. Die Isolation erfolgte unter sterilen Bedingungen und nach folgendem Schema:

1. 9 ml Vollblut mit 21 ml CMF-PBS-Puffer vermischen
2. 15 ml Ficoll mit einem spezifischen Gewicht von 1,077 g/ml in einem 50 ml-Falcon-Gefäß vorlegen und die 30 ml des verdünnten Blutes vorsichtig darüber schichten

3. Zentrifugation bei 400 g bei 20°C für 30 min
4. Abheben des buffy-coats mit einer sterilen Pasteurpipette und Überführung in ein neues 50 ml Gefäß
5. Auffüllen mit 50 ml CMF-PBS-Puffer
6. Zentrifugation bei 300 g bei 10°C für 10 min
7. Nach der Abhebung des Überstandes verbleibt nun das Zellpellet am Boden des Gefäßes

Bei Bedarf konnten die Punkte 5 und 6 wiederholt werden. Das Zellpellet sollte so die gewünschten MNCs und damit HSPCs enthalten. Zur Fertigstellung der Zellsuspension wurden die CD34-positiven Zellen von den MNCs mithilfe von an magnetischen Partikeln gebundenen Antikörpern separiert. Nach erfolgter Inkubation und Bindung der Antikörper an den CD34-Rezeptoren wurden die Zellen durch eine Säule gepresst, die sich in einem magnetischen Feld befand. Während diesem Prozess blieben die Antikörper mit den CD34-positiven Zellen an der Säulenwand haften. Anschließend erfolgte außerhalb des Magnetfelds die Spülung, wodurch die rezeptor-positiven Zellen gewonnen wurden. Die Separierung wurde nach folgendem Schema ausgeführt:

1. Zu 10^8 Zellen werden 100 μ l FcR-Blocking-Reagent sowie 100 μ l CD34 Microbeads hinzugefügt
2. Inkubation bei 4°C für 30 min nach sorgfältiger Durchmischung der Suspension
3. Zugabe von 5-10 ml MACS-Puffer und Zentrifugation bei 300 g für 10 min
4. Verwerfen des Überstandes und Resuspension in 500 μ l MACS-Puffer
5. Die Säule im Magnetfeld wird mit 3 ml MACS-Puffer durchgespült
6. Einbringen der Probe in die obere Öffnung der Säule – der Durchfluss wird dabei aufgefangen
7. Spülung der Säule (3x) mit 3 ml MACS-Puffer.
8. Außerhalb des Magnetfeldes werden die CD34-positiven Zellen anschließend mit 5 ml MACS-Puffer unter Zuhilfenahme eines speziellen Stempels herausgepresst

Gegebenenfalls wurden die einzelnen Schritte wiederholt, um einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen. Der Erfolg der Separation wurde im Anschluss durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.1.2 PASSAGIERUNG

Nach Fertigstellung der Zellsuspension wurden die HSCs in Kultur gebracht. Beginnend mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen wurden sie mit einem Stammzellmedium bestehend aus 100 ml FBS (10%), 1 ml Stem Cell Factor (50 ng/ml), 1 ml Flt3/Flk2 (50 ng/ml), 1 ml Interleukin 6 (10 ng/ml), 1 ml TPO (10 ng/ml) und 896 ml CMF-PBS mit Phenolrot für sieben Tage bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturflaschen (75 bzw. 225 cm²) inkubiert. Für weiterführende Untersuchungen wurde ein Teil der wöchentlich entnommenen Zellen wieder durch MACS angereichert, um bei der Analyse eine standardisierte Population der CD34+ Zellen zu berücksichtigen.

2.2 COLONY-FORMING-CELL-ASSAY

Mittels Colony Forming Cell Assay (CFC-Assay) wurde die Anzahl der teilungsfähigen HSPCs gemessen. Das Hauptaugenmerk fiel dabei auf die CFU-GM und BFU-E.

2.2.1 PRIMÄRANSATZ

Für den Primäransatz wurden die Zellen am Institut für Pathophysiologie Graz kultiviert und analysiert. Jede Passage wurde unter sterilen Bedingungen und unter Berücksichtigung verschiedener Verdünnungsschritte in eine 12 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Für den Versuch kamen die Kulturmedien Methocult® (Methocult® H4534 classic without/ with EPO, Stem Cell Technologies, Vancouver/ Canada) und IMDM® (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) zum Einsatz. Nach Berechnung des Zielzellvolumens wurden die CD34+ Zellen und die MNCs jeweils einmal ohne EPO in 6 Wells und einmal mit EPO in 4 Wells einer 12 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Berechnung für das IMDM®-Volumen ergab sich aus der Differenz von 50µl und dem Zielzellvolumen. Vom Methocult® wurden pro Well 500µl zugesetzt, so dass das Gesamtvolumen pro Well stets 550µl betrug. Um eine möglichst gute Verteilung der einzelnen Zellen auf der Platte zu erreichen und so später die gebildeten Kolonien besser voneinander unterscheiden zu können, wurde die Platte zunächst bei 800 Umdrehungen pro Minute im Mikrotiterplatten-Mixer gerüttelt. Anschließend wurde jedes Well mit einer sterilen 200µl Pipettenspitze umgerührt. Um die Kultur während der mehrtägigen Inkubation vor Austrocknung zu schützen, wurden die ausgesparten Felder mit sterilem destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die gebildeten Kolonien wurden am Tag 8 nach dem Ansatz im Umkehrmikroskop bei 4-facher Vergrößerung ausgezählt. Eine Kolonie zählte als solche, wenn sie aus 40 oder mehr Zellen bestand, welche in enger räumlicher Beziehung zueinander und gleichzeitig gut voneinander abgrenzbar waren. Falls eine zu hohe Zellkonzentration eine Abgrenzbarkeit unmöglich machte (=“overplated“), wurde das betroffene Feld nicht für die Auswertung herangezogen.

Um die unterschiedlichen Verdünnungsschritte mit einander vergleichen zu können, wurden die eingesetzte Konzentration und die Reinheit (siehe Anhang) der jeweiligen Probe berücksichtigt und so ein Wiederfindungswert (w) bzw. Reinheitswert (r) berechnet.

Formel für das Zielzellvolumen 1 (n_1) bei einem Kultivierungsvolumen von 1 ml Methocult®:

$$\frac{l}{x} * \frac{z}{10^{(y-m)}} = n_1$$

- x.. Faktor der erhaltenen Probe
- y.. Exponent der erhaltenen Probe
- z.. Volumen der erhaltenen Probe [μ l]
- l.. Faktor der Zielprobe
- m.. Exponent der Zielprobe
- n_1 .. Zielzellvolumen 1 [μ l]

Formel für die Umrechnung auf ein Kultivierungsvolumen von 500 μ l Methocult®:

$$\frac{n_1}{2} = n_2$$

- n_1 .. Zielzellvolumen 1 [μ l]
- n_2 .. Zielzellvolumen 2 [μ l]

Formel für das IMDM®-Volumen:

$$50 - n_2 = \text{IMDM}$$

- n_2 .. Zielzellvolumen 2 [μ l]
- IMDM.. IMDM-Volumen [μ l]

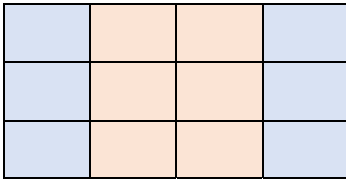


Abbildung 4: Aufteilungsschema in 12 Mikrotiterplatte ohne EPO
 blau: destilliertes Wasser; orange: Zellmaterial ohne EPO

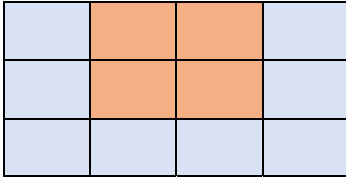


Abbildung 5: Aufteilungsschema in 12 Mikrotiterplatte mit EPO
 blau: destilliertes Wasser; orange: Zellmaterial mit EPO

Formel für den Wiederfindungswert (w):

$$\frac{k_1}{c} * 100 = w$$

k₁.. Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml]

c.. eingesetzte Konzentration [Zellen/ml]

w.. Wiederfindungswert [%]

Formel für den Reinheitswert (r):

$$\frac{w}{p} * 100 = r$$

w.. Wiederfindungswert [%]

p.. Reinheit der Probe [%]

r.. Reinheitswert [%]

Da es bei der Bearbeitung der Daten nicht möglich war, die Kolonien aller HSCs zu exakt den gleichen Zeitpunkten auszuwerten, wurden die Passagen (P) im späteren Verlauf zusammengefasst. Für die Primäransätze der MNCs und CD34+ Zellen wurde dabei folgendes Schema herangezogen: P0 (Beginn der Passagierung), P1, P2 und P3 einzeln; bis Passage 12 im Zweierwochenblock: P4,5 (P4+5), P6,5 (P6+7), P8,5 (P8+9) und P10,5 (P10+11); bis Passage 20 im Viererwochenblock: P13,5 (P12 bis 15) und P17,5 (P16+19); bis zum Ende der Passagierung im Sechserwochenblock: P22,5 (P20 bis 25), P28,5 (P26 bis 31) und P35 (P32 bis 38). Für die CFUs der MNCs und CD34+ Zellen wurde folgendes Schema herangezogen: P0 (Beginn der Passagierung), P1, P2 und P3 einzeln; bis Passage 12 im Zweierwochenblock: P4,5 (P4+5), P6,5 (P6+7), P8,5 (P8+9) und P10,5 (P10+11); bis Passage 20 im Viererwochenblock: P13,5 (P12 bis 15) und P17,5 (P16+19); Am Ende der Passagierung wurden 7 Wochen zusammengefasst: P23 (P20 bis 26).

2.2.2 SEKUNDÄRANSATZ

Aufgrund der Größe des Projektes fand eine Aufteilung auf zwei Diplomarbeiten statt. In der vorliegenden Arbeit wird auf den Primäransatz der MNCs und CD34+ Zellen eingegangen. In einer weiteren Arbeit (von Martin Rinofner) werden der Sekundäransatz und potenzielle molekulargenetische Veränderungen beschrieben.

Für den Sekundäransatz wurden die gebildeten Kolonien unmittelbar nach der Auszählung unter sterilen Bedingungen und unter mikroskopischer Sicht einzeln in 30 Wells einer 48 Well- Mikrotiterplatte pipettiert. Um eine Dehydratation der Zellen zu verhindern, wurden 10µl IMDM® in die Wells vorgelegt, in welchem die Kolonie dann vorsichtig resuspendiert wurden. Hierfür wurde jede Kolonie mit einer 10µl Kolbenhubpipette aufgenommen und in ein Well überführt. Anschließend wurden 100µl Methocult® without EPO hinzugefügt. Wie beim Primäransatz wurde jedes Well mit einer sterilen 200µl Pipettenspitze umgerührt und die ausgesparten Wells wiederum mit sterilem destilliertem Wasser versehen. Die Inkubation erfolgte mehrere Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die sekundären Kolonien wurden nach dem Ansatz in der Regel am Tag 16 (zwischen Tag 12 und Tag 22) im Umkehrmikroskop ausgezählt. Auch hier zählte eine Kolonie als solche, wenn sie aus 40 oder mehr Zellen bestand, welche in enger räumlicher Beziehung zueinander und gleichzeitig gut voneinander abgrenzbar waren. Falls eine zu hohe Zellkonzentration eine Abgrenzbarkeit unmöglich machte (=“overplated“), wurde das betroffene Feld nicht für die Auswertung herangezogen. Da zur Bildung einer Kolonie eine CFU im sekundären Ansatz anwesend sein musste, folgte daraus, dass die ursprüngliche CFU Self-renewal betrieben hatte.

3 ERGEBNISSE

Die Tabellen 3 bis 7 geben die Anzahl der gebildeten Kolonien des Primäransatzes der MNCs und die Tabellen 8 bis 12 die der CD34+ Zellen wieder. Um die Ergebnisse, die in unterschiedlichen Verdünnungsschritten kultiviert wurden, miteinander vergleichen zu können, wurde in Bezug zur eingesetzten Konzentration (Zellzahl pro ml Zellsuspension) ein Wiederfindungswert (w) und in Bezug zur Reinheit der Probe (siehe Anhang) ein Reinheitswert (r) errechnet. Die Wiederfindungswerte der MNCs sind in den Tabellen 13 bis 17 und die der CD34+ Zellen in den Tabellen 18 bis 22 dargestellt. Unter Berücksichtigung der Reinheitswerte präsentieren die Abbildungen 6 und 7 den Verlauf der MNCs und der CD34+ Zellen. Die Tabellen 23 bis 32 stellen die Anzahl der gebildeten Kolonien des Primäransatzes der CFU-GM und BFU-E der MNCs und die Tabellen 33 bis 42 die der CD34+ Zellen dar. Zur Veranschaulichung der Wiederfindungswerte der weißen (CFU-GM) und roten Kolonien (BFU-E) der MNCs und der CD34+ Zellen dienen die Tabellen 43 bis 47 (MNCs) bzw. 48 bis 52 (CD34+). Unter Berücksichtigung der Reinheitswerte präsentieren die Abbildungen 8 und 9 den Verlauf der CFU-GM und BFU-E. Mittels prozentualer Veränderung (Percentage Change) der CFU-GM und BFU-E des Primäransatzes wird in den Tabellen 53 bis 54 und in den Abbildungen 10 bis 13 die prozentuale Abnahme der weißen und roten Kolonien durch wöchentliche Passagierung dargestellt.

3.1 PRIMÄRANSATZ DER MNCs UND DER CD34+ ZELLEN

Die gebildeten Kolonien des Primäransatzes wurden am Tag 8 unter mikroskopischer Sicht ausgezählt. Eine Kolonie zählte als solche, wenn sie aus 40 oder mehr Zellen bestand. In den Tabellen entspricht die Konzentrationsangabe der Anzahl der MNCs bzw. CD34+ Zellen, die pro ml Zellsuspension eingesetzt wurden. Die Abkürzungen „P“ und „W“ stehen für die jeweilige Passage bzw. das Well der Mikrotiterplatte, in welchem die Kolonien ausgezählt wurden.

3.1.1 PRIMÄRANSATZ DER MNCs

Die Tabellen 3 bis 7 geben die Anzahl der gebildeten Kolonien des Primäransatzes der MNCs wieder.

Tabelle 3: Primäransatz der MNCs der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 15 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴			2,00*10 ⁴		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
03							34	20	27			
05							33	27				
07				64	60	62						
09				36	39	37,5						
				42	43	42,5						
13				38	34	36						
				30	31	30,5						
15				23		23	64	44	54			
17												
21				7	10	8,5						

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,25*10⁴ bis 2,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well

Tabelle 4: Primäransatz der MNCs der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien
[Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 16 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴			2,00*10 ⁴		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
0				3	3	3	4	3	3,5			
02				40	50	45						
03				59	73	66						
04				33	24	28,5	34	32	33			
10	4	5	4,5	15	13	14	19	17	18			
11				11	11	11						
13	4	4	4	8	11	9,5	20	14	17			

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,25*10⁴ bis 2,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well

Tabelle 5: Primäransatz der MNCs der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien
[Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 17 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴			2,00*10 ⁴		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
0	39	46	42,5									
01				122	97							
03	14	17	15,5									
05				40	42	41						
09				18	12	15						
11							32	18	25	35	36	35,5
13							38	34	36			
15							28	27	27,5	59	54	56,5
18							30	45,5	37,75			
33							31	32	31,5			
38							42	50	46			

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,25*10⁴ bis 2,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well

Tabelle 6: Primäransatz der MNCs der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 19 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴			2,00*10 ⁴		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
01				77+72	80+79	74,5						
06				11	13	12	36	36	36	6	3	4,5
13				55		55						
17				56	50	53						
21				100	90	95						
23	27	25	26	51	42	46,5	81	94	87,5			
27	24	24	24	32	31	31,5						
33			*			*			*			
36			*			*						

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,25*10⁴ bis 2,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well; *P33: 0,25xE⁴: 19+25+23; Ø **22,5**; *P33: 0,5xE⁴: 40+60+63; Ø **56,5**; *P33: 1xE⁴: 22+18+18+13; Ø **17,75**; *P36: 0,25xE⁴: 47+22+44; Ø **39,5**; * P36: 0,5xE⁴: 62+77+62; Ø **65,75**

Tabelle 7: Primäransatz der MNCs der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 21 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴			2,00*10 ⁴		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
03				91	71	81						
05				48	52	50						
07	19	15	17	39	41	40						
10	37	37	37									
18			*			*						
27						*						

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,25*10⁴ bis 2,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well; *P18: 0,25xE⁴: 14+13+14+17; Ø **14,5**; *P18: 0,5xE⁴: 36+39+21+29; Ø **31,25**; *P27: 0,5xE⁴: 9+19+15+20+15; Ø **16**

3.1.2 PRIMÄRANSATZ DER CD34+ ZELLEN

Die Tabellen 8 bis 12 geben die Anzahl der gebildeten Kolonien des Primäransatzes der CD34+ Zellen wieder.

Tabelle 8: Primäransatz der CD34+ der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 15 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,50*10 ³			1,00*10 ³			2,00*10 ³			4,00*10 ³		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
03	1	1	1	1	0	0,5						
05							30	17	23,5			
07										35	32	33,5
09							16	17	16,5			
							14	16	15			
13							14	15	14,5	47	39	43
15							18	17	17,5	27	34	30,5
17												
21							13	16	14,5	20	16	18

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, CD34+: CD34-positive Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,50*10³ bis 4,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well

Tabelle 9: Primäransatz der CD34+ der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 16 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ³			0,50*10 ³			1,00*10 ³			2,00*10 ³		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
0				23	30	26,5						
				34		34						
03	13	8	10,5	18	19	18,5	33	30	31,5			
04				14	7	10,5	18	14	16			
11							5	3	4	13	19	16
13							7	7	7	13	17	15

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, CD34+: CD34-positive Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,25*10³ bis 2,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well

Tabelle 10: Primäransatz der CD34+ der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 17 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,50*10 ³			1,00*10 ³			2,00*10 ³			4,00*10 ³		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
0*												
03		49	49									
				22	23	22,5						
09				12	14	13	19	19	19			
11				41	27	34	7	39	23	81	74	77,5
13				14	18	16	20	15	17,5	59	71	65
15				20	19	19,5	21	23	22	48	50	49
18				19	11	15						
33							10	9	9,5	14	13	13,5

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, CD34+: CD34-positive Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,50*10³ bis 4,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well; *P0: 0,25x10³: 39+46; Ø **42,5**; P38: 8x10³: 1; Ø **1**

Tabelle 11: Primäransatz der CD34+ der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 19 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ³			0,50*10 ³			1,00*10 ³			2,00*10 ³		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
0*	21	20	20,5	36	37	36,5						
06										6	3	4,5
13				4	2	3				5	8	6,5
17*										11	15	13
21*												
23*												
27*												

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, CD34+: CD34-positive Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,25*10³ bis 2,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well; *P0: 0,125x10³: 7+8; **Ø 7,5**; *P17: 4x10³: 21+22+16+24; **Ø 20,75**; *P21: 4x10³: 42+29+24+28; **Ø 30,75**; *P21: 8x10³: 48+56+49+60; **Ø 53,25**; *P23: 4x10³: 12+14+11; **12**; *P23* 8x10³: 20+20+26; **23**; *P27: 4x10³: 4+8+7+6; **Ø 6,25**; *P27: 8x10³: 18+14; **Ø 16**;

Tabelle 12: Primäransatz der CD34+ der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension]

HSC 21 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ³			0,50*10 ³			1,00*10 ³			2,00*10 ³		
P	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø	1.W	2.W	Ø
03	1	3	2	5	10	7,5	14	13	13,5			
05	4	2	3	18	17	17,5	16	12	14			
07	7	6	6,5	7	8	7,5	20	14	17	33	27	30
10				3	2	2,5	4	8	6	14	14	14

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, CD34+: CD34-positive Zellen, P: Passage [Wochen], W: Well der Mikrotiterplatte; 0,25*10³ bis 2,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml] pro Passage je Well

3.1.3 VERLAUF DER MNCs UND CD34+ ZELLEN

Um die Ergebnisse der Primäransätze, die in unterschiedlichen Verdünnungsschritten kultiviert wurden, mit einander vergleichen zu können, wurde in Bezug zur eingesetzten Konzentration (Zellzahl pro ml Zellsuspension) ein Wiederfindungswert (w) und in Bezug zur Reinheit der Probe (siehe Anhang) ein Reinheitswert (r) errechnet. Die Wiederfindungswerte der MNCs sind in den Tabellen 13 bis 17 und die der CD34+ Zellen in den Tabellen 18 bis 22 dargestellt. Unter Berücksichtigung der Reinheitswerte präsentieren die Abbildungen 6 und 7 den Verlauf der MNCs und der CD34+ Zellen.

Tabelle 13: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 15 MNCs						
	Ø	c	w	Ø	c	w
03	27	1,00*10 ⁴	0,27			
05	30	1,00*10 ⁴	0,30			
07	62	0,50*10 ⁴	1,24			
09	40	0,50*10 ⁴	0,8			
13	33,25	0,50*10 ⁴	0,67			
15	23	0,50*10 ⁴	0,46	54	1,00*10 ⁴	0,54
21	8,5	0,50*10 ⁴	0,17			

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 03-21: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 14: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 16 MNCs									
	Ø	c	w	Ø	c	w	Ø	c	w
00	3	0,50*10 ⁴	0,06	3,5	1,00*10 ⁴	0,035			
02	45	0,50*10 ⁴	0,9						
03	66	0,50*10 ⁴	1,32						
04	28,5	0,50*10 ⁴	0,57	33	1,00*10 ⁴	0,33			
10	4,5	0,25*10 ⁴	0,18	14	0,50*10 ⁴	0,28	18	1,00*10 ⁴	0,18
11	11	0,50*10 ⁴	0,22						
13	4	0,25*10 ⁴	0,16	9,5	0,50*10 ⁴	0,19	17	1,00*10 ⁴	0,17

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-13: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 15: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 17 MNCs						
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	42,5	0,25*10 ⁴	1,7			
01	109,5	0,50*10 ⁴	2,19			
03	15,5	0,25*10 ⁴	0,62			
05	41	0,50*10 ⁴	0,82			
09	15	0,50*10 ⁴	0,3			
11	25	1,00*10 ⁴	0,25	35,5	2,00*10 ⁴	0,18
13	36	1,00*10 ⁴	0,36			
15	27,5	1,00*10 ⁴	0,28	56,5	2,00*10 ⁴	0,28
18	43	1,00*10 ⁴	0,43	37,75	2,00*10 ⁴	0,19
33	31,5	1,00*10 ⁴	0,32			
38	48,5	1,00*10 ⁴	0,49	46	2,00*10 ⁴	0,23

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-38: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 16: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 19 MNCs						
	Ø	c	w	Ø	c	w
01	77	0,50*10 ⁴	1,54			
06	12	0,50*10 ⁴	0,24	36	1,00*10 ⁴	0,36
	4,5	2,00*10 ⁴	0,02			
13	55	0,50*10 ⁴	1,1			
17	53	0,50*10 ⁴	1,06			
21	26	0,25*10 ⁴	1,04	95	0,50*10 ⁴	1,9
23	46,5	0,50*10 ⁴	0,93	87,5	1,00*10 ⁴	0,88
27	24	0,25*10 ⁴	0,96	31,5	0,50*10 ⁴	0,63
33	22,5	0,25*10 ⁴	0,9	56,5	0,50*10 ⁴	1,13
	17,75	1,00*10 ⁴	0,18			
36	39,25	0,25*10 ⁴	1,57	65,75	0,50*10 ⁴	1,32

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 01-36: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 17: Wiederfindungswerte des MNC-Primäransatzes der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 21 MNCs						
	Ø	c	w	Ø	c	w
03	81	0,50*10 ⁴	1,62			
05	50	0,50*10 ⁴	1			
07	17	0,25*10 ⁴	0,68	40	0,50*10 ⁴	0,8
10	37	0,25*10 ⁴	1,48			
18	14,5	0,25*10 ⁴	0,58	31,25	0,50*10 ⁴	0,63
27	16	0,50*10 ⁴	0,32			

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 03-27: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 18: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 15 CD34+									
	Ø	c	w	Ø	c	w	Ø	c	w
00	1	0,50*10 ³	0,2	0,5	1,00*10 ³	0,05			
05	23,5	2,00*10 ³	1,18						
07	33,5	2,00*10 ³	1,68						
09	15,75	2,00*10 ³	0,79						
13	14,5	2,00*10 ³	0,73	43	4,00*10 ³	1,08			
15	17,5	2,00*10 ³	0,88	30,5	4,00*10 ³	0,76			
21	14,5	2,00*10 ³	0,73	18	4,00*10 ³	0,45			

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-21: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 19: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 16 CD34+									
	Ø	c	w	Ø	c	w	Ø	c	w
00	30,25	0,50*10 ³	6,05						
03	10,5	0,25*10 ³	4,2	18,5	0,50*10 ³	3,7	31,5	1,00*10 ³	3,15
04	10,5	0,50*10 ³	2,1	16	1,00*10 ³	1,6	16	1,00*10 ³	1,6
11	4	1,00*10 ³	0,4	16	2,00*10 ³	0,8			
13	7	1,00*10 ³	0,7	15	2,00*10 ³	0,75			

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-13: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 20: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 17 CD34+									
	Ø	c	w	Ø	c	w	Ø	c	w
00	42,5	0,25*10 ³	17						
03	49	0,50*10 ³	9,8						
04	22,5	1,00*10 ³	2,25						
09	13	1,00*10 ³	1,3	19	2,00*10 ³	0,95			
11	34	1,00*10 ³	3,4	23	2,00*10 ³	1,15	77,5	4,00*10 ³	1,94
13	16	1,00*10 ³	1,6	17,5	2,00*10 ³	0,88	65	4,00*10 ³	1,63
15	19,5	1,00*10 ³	1,95	22	2,00*10 ³	1,1	49	4,00*10 ³	1,23
18	15	1,00*10 ³	1,5						
33	9,5	2,00*10 ³	0,48	13,5	4,00*10 ³	0,34			

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-33: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 21: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 19 CD34+									
	Ø	c	w	Ø	c	w	Ø	c	w
0	7,5	0,125*10 ³	6	20,5	0,25*10 ³	8,2			
	36,5	0,50*10 ³	7,3						
06	4,5	2,00*10 ³	0,23						
08	6	1,00*10 ³	0,6						
13	3	0,50*10 ³	0,6	6,5	2,00*10 ³	0,33			
17	13	2,00*10 ³	0,65	20,75	4,00*10 ³	0,52			
21	30,75	4,00*10 ³	0,77	53,25	8,00*10 ³	0,67			
23	12	4,00*10 ³	0,3	23	8,00*10 ³	0,29			
27	6,25	4,00*10 ³	0,16	16	8,00*10 ³	0,2			

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-27: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 22: Wiederfindungswerte des CD34+-Primäransatzes der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 21 CD34+						
	Ø	c	w	Ø	c	w
03	7,5	0,50*10 ³	1,5	13,5	1,00*10 ³	1,35
05	17,5	0,50*10 ³	3,5	14	1,00*10 ³	1,4
07	7,5	0,50*10 ³	1,5	17	1,00*10 ³	1,7
10	2,5	0,50*10 ³	0,5	6	1,00*10 ³	0,6

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 03-10: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

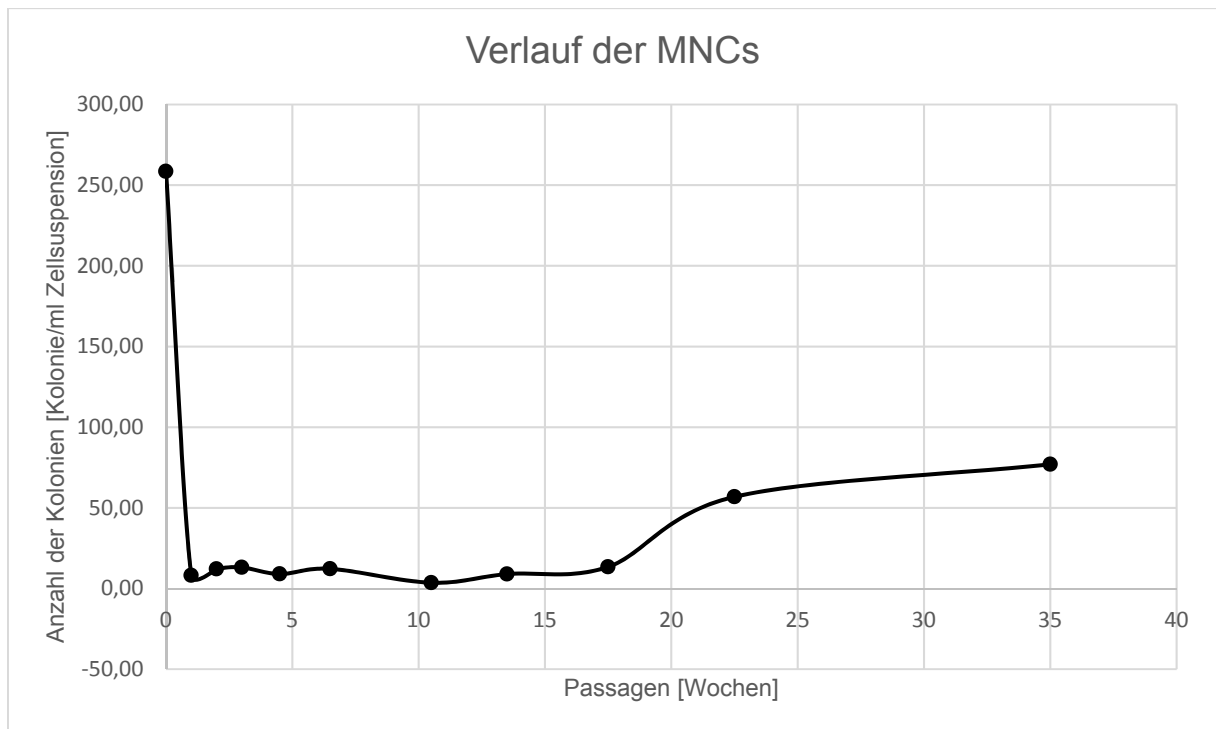


Abbildung 6: Verlauf der MNCs der HSC 15/16/17/19/21 von P0 bis P35 unter Berücksichtigung der Wiederfindungs- und Reinheitswerte in Anlehnung an die Tabellen 13 bis 17 und an die Reinheit der Proben (siehe Tabelle im Anhang); p: Reinheit der Probe [%], r: Reinheitswert [%], w: Wiederfindungswert [%]; $r = \frac{w}{p} * 100$

Die Kolonienanzahl der MNCs zu Beginn der Passagierung (P0) beträgt im Durchschnitt 258,48 Kolonien pro ml Zellsuspension. Am Ende des ersten Monats (zwischen P4 und P5) ist die Anzahl auf 9,01 Kolonien und nach etwa 3 Monaten (zwischen P12 und P15) auf 8,97 Kolonien zurückgegangen. Zwischen den Passagen 16 und 19 steigt die Kolonienanzahl auf durchschnittlich 13,42 an und beträgt nach ca. 8 Monaten, am Ende der Passagierung (P35), 76,96 Kolonien pro ml Zellsuspension.

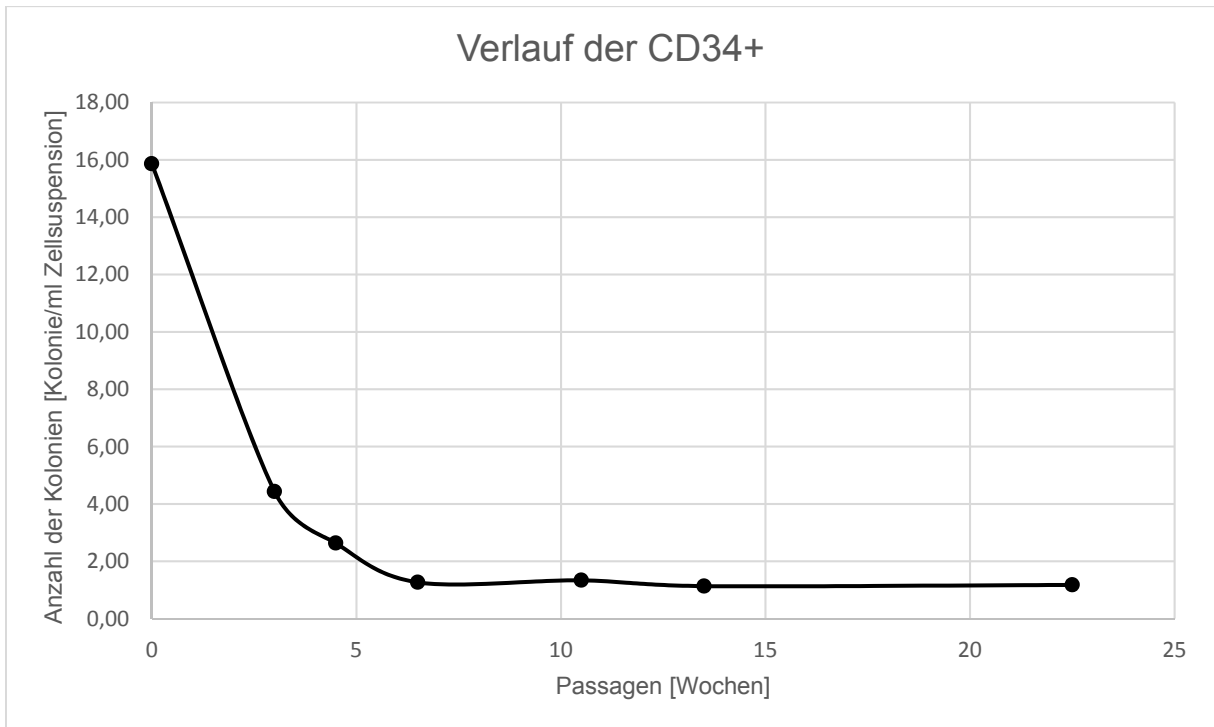


Abbildung 7: Verlauf der CD34+ Zellen der HSC 15/16/17/19/21 von P0 bis P23 unter Berücksichtigung der Wiederfindungs- und Reinheitswerte in Anlehnung an die Tabellen 18 bis 22 und an die Reinheit der Proben (siehe Tabelle im Anhang); p: Reinheit der Probe [%], r: Reinheitswert [%], w: Wiederfindungswert [%]; $r = \frac{w}{p} * 100$

Die Kolonienanzahl der CD34+ Zellen zu Beginn der Passagierung (P0) beträgt im Durchschnitt 15,86 Kolonien pro ml Zellsuspension. Am Ende des ersten Monats (zwischen P4 und P5) ist die Anzahl auf 2,63 Kolonien und nach etwa 3 Monaten (zwischen P12 und P15) auf 1,13 Kolonien zurückgegangen. Nach ca. 5 Monaten, am Ende der Passagierung (P22,5), beträgt die Anzahl 1,18 Kolonien pro ml Zellsuspension.

3.2 CFU-GM UND BFU-E

Am Tag 16 wurde die Kolonienanzahl des Primäransatzes der CFU-GM und der BFU-E unter mikroskopischer Sicht erfasst. Die Auszählung der Kolonien gab die Proliferationsfähigkeit der HSPCs wieder. In den Tabellen entspricht die Konzentrationsangabe der Anzahl der MNCs bzw. CD34+ Zellen, die pro ml Zellsuspension eingesetzt wurden. Während die Abkürzung „P“ für die jeweilige Passage steht, stellen die Abkürzungen „CFU-GM1 bzw. -GM2“ und „BFU-E1 bzw. -E2“ für das Well der Mikrotiterplatte, in welchem die Kolonien ausgezählt wurden, dar.

3.2.1 CFU-GM UND BFU-E DER MNCs

Die Tabellen 23 bis 32 stellen die Anzahl der gebildeten Kolonien des Primäransatzes der CFU-GM und BFU-E der MNCs dar.

Tabelle 23: CFU-GM der MNCs der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der MNCs der HSC15

HSC 15 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴		
P	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø
03				42	49	45,5
07	42	28	35			
09				27	24	25,5
13	39	47	43	72	67	69,5
17	20	61	40,5	15	33	24
21	31	25	28	38	33	35,5
26				31	25	28

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonienanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,50*10⁴ bis 1,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 24: BFU-E der MNCs der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der MNCs der HSC15

HSC 15 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴		
P	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø
03				1	0	0,5
07	0	0	0			
09				0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
26				0	0	0

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,50*10⁴ bis 1,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 25: CFU-GM der MNCs der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der MNCs der HSC16

HSC 16 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴		
P	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø
0				3	0	1,5
03				51	50	50,5
04				36	18	27
10	20		20	40		40
11	10	10	10	14	13	13,5
13	9	9	9	17	16	16,5
19				26	35	30,5

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,25*10⁴ bis 0,50*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 26: BFU-E der MNCs der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der MNCs der HSC16

HSC 16 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴		
P	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø
0				2	3	2,5
03				0	1	0,5
04				0	0	0
10	0		0	0		0
11	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
19				0	0	0

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,25*10⁴ bis 0,50*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 27: CFU-GM der MNCs der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der MNCs der HSC17

HSC 17 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴		
P	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø
01	42	50	46			
03	26	31	28,5			
04	20	30	25	48	65	56,5
05	45	36	40,5			
07	33	23	28			
09	38	39	38,5			
11	20		20	29	36	32,5
13	29	44	36,5			
15				39	43	41

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,25*10⁴ bis 0,50*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 28: BFU-E der MNCs der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der MNCs der HSC17

HSC 17 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴		
P	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø
01	16	20	18			
03	0	1	0,5			
04	0	0	0	4	1	2,5
05	0	0	0			
07	0	0	0			
09	0	0	0			
11				0	0	0
13	0	0	0			
15				0	0	0

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,25*10⁴ bis 0,50*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 29: CFU-GM der MNCs der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der MNCs der HSC19

HSC 19 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴		
P	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø
01	68	67	67,5			
03*	48	61	54,5			
06	22	20	21			
08	26	35	30,5	64	58	61

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,50*10⁴ bis 1,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well; *P3: 0,25x10⁴: 31+38; **Ø 34,5**

Tabelle 30: BFU-E der MNCs der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der MNCs der HSC19

HSC 19 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,50*10 ⁴			1,00*10 ⁴		
P	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø
01	12	7	9,5			
03*	0	2	1			
06	0	0	0			
08	0	0	0	0	0	0

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,50*10⁴ bis 1,00*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well; *P3: 0,25x10⁴: 0+0; **Ø 0**

Tabelle 31: CFU-GM der MNCs der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der MNCs der HSC21

HSC 21 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴		
P	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø
03				61	71	66
05	33	29	31	59	43	51
07	35	43	39	60	80	70

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,25*10⁴ bis 0,50*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 32: BFU-E der MNCs der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der MNCs der HSC21

HSC 21 MNCs	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,25*10 ⁴			0,50*10 ⁴		
P	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø
03				1	1	1
05	0	2	1	0	0	0
07	1	0	0,5	2	0	1

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, MNCs: mononukleäre Zellen, P: Passage [Wochen]; 0,25*10⁴ bis 0,50*10⁴: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

3.2.2 CFU-GM UND BFU-E DER CD34+ ZELLEN

Die Tabellen 33 bis 42 stellen die Anzahl der gebildeten Kolonien des Primäransatzes der CFU-GM und BFU-E der CD34+ Zellen dar.

Tabelle 33: CFU-GM der CD34+ der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der CD34+ der HSC15

HSC 15 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	2,00*10 ³			4,00*10 ³		
P	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø
09	7	12	9,5			
13	38	36	37			
17	32	30	31			
21	38	37	37,5			
26	15	22	18,5			

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 2,00*10³ bis 4,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 34: BFU-E der CD34+ der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der CD34+ der HSC15

HSC 15 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	2,00*10 ³			4,00*10 ³		
P	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø
09	0	0	0			
13	0	0	0			
17	0	0	0			
21	0	0	0			
26	0	0	0			

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, CD34+: CD34-positive Zellen, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,25*10³ bis 2,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 35: CFU-GM der CD34+ der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der CD34+ der HSC16

HSC 16 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ³			0,50*10 ³			1,00*10 ³			2,00*10 ³		
P	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø
0	52	46	49									
03	5	15	10	21	18	19,5						
04				14	11	12,5						
10							18	24	21			
11							16	18	17			
13							10	9	9,5	16	17	16,5

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,25*10³ bis 2,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 36: BFU-E der CD34+ der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der CD34+ der HSC16

HSC 16 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,25*10 ³			0,50*10 ³			1,00*10 ³			2,00*10 ³		
P	BFU- E 1	BFU- E 2	Ø	BFU- E 1	BFU- E 2	Ø	BFU- E 1	BFU- E 2	Ø	BFU- E 1	BFU- E 2	Ø
0	11	16	13,5									
03	0	0	0	0	1	0,5						
04				0	0	0						
10							0	0	0			
11							0	0	0			
13							0	0	0	0	0	0

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, CD34+: CD34-positive Zellen, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,25*10³ bis 2,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 37: CFU-GM der CD34+ der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der CD34+ der HSC17

HSC 17 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]								
	0,15*10 ³			0,50*10 ³			1,00*10 ³		
P	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø
0	58	55	56,5						
03							24		24
04				50		50			
07				25	22	23,5			
09				18	32	25	38	36	37
11				41	44	42,5			
13				24	20	22			
15				27	20	23,5			

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,15*10³ bis 1,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 38: BFU-E der CD34+ der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der CD34+ der HSC17

HSC 17 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]								
	0,15*10 ³			0,50*10 ³			1,00*10 ³		
P	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø
0	17	18	17,5						
03							2		2
04				7		7			
07				0	1	0,5			
09				0	0	0	0	0	0
11				0	0	0			
13				0	0	0			
15				0	0	0			

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, CD34+: CD34-positive Zellen, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,15*10³ bis 1,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 39: CFU-GM der CD34+ der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM der CD34+ der HSC19

HSC 19 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,125*10 ³			0,25*10 ³			0,50*10 ³			2,00*10 ³		
P	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø	CFU- GM 1	CFU- GM 2	Ø
0	8	8	8	19	22	20,5						
03				4	5	4,5	11	16	13,5			
06							8	9	8,5			
08										21	25	23

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,125*10³ bis 2,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 40: BFU-E der CD34+ der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der CD34+ der HSC19

HSC 19 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]											
	0,125*10 ³			0,25*10 ³			0,50*10 ³			2,00*10 ³		
P	BFU- E 1	BFU- E 2	Ø	BFU-E 1	BFU- E 2	Ø	BFU- E 1	BFU- E 2	Ø	BFU- E 1	BFU- E 2	Ø
0	9	8	8,5	12	11	11,5						
03				1	0	0,5	1	0	0,5			
06							0	0	0			
08										0	0	0

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, CD34+: CD34-positive Zellen, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,125*10³ bis 2,00*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 41: CFU-GM der CD34+ der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] CFU-GM der CD34+ der HSC21

HSC 21 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,25*10 ³			0,50*10 ³		
P	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø	CFU-GM 1	CFU-GM 2	Ø
03	4	7	5,5	10	17	13,5
05	11	7	9	17	13	3
07	2	5	3,5	14	13	13,5

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM1 bzw. -GM2: Kolonieanzahl der CFU-GM im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,25*10³ bis 0,50*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

Tabelle 42: BFU-E der CD34+ der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der BFU-E der CD34+ der HSC21

HSC 21 CD34+	KONZENTRATION [Zellzahl/ml Zellsuspension]					
	0,25*10 ³			0,50*10 ³		
P	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø	BFU-E 1	BFU-E 2	Ø
03	0	0	0	0	0	0
05	0	1	0,5	0	0	0
07	0	0	0	0	0	0

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, CD34+: CD34-positive Zellen, BFU-E1 bzw. -E2: Kolonieanzahl der BFU-E im Well1 bzw. Well2, P: Passage [Wochen]; 0,25*10³ bis 0,50*10³: Konzentrationen der Zellprobe [Zellzahl/ml Zellsuspension] pro Passage je Well

3.2.3 VERLAUF DER CFU-GM UND BFU-E

Um die Ergebnisse der Primäransätze der CFU-GM und BFU-E, die in unterschiedlichen Verdünnungsschritten kultiviert wurden, mit einander vergleichen zu können, wurde in Bezug zur eingesetzten Konzentration (Zellzahl pro ml Zellsuspension) ein Wiederfindungswert (w) und in Bezug zur Reinheit der Probe (siehe Anhang) ein Reinheitswert (r) errechnet. Zur Veranschaulichung der Wiederfindungswerte der CFU-GM und BFU-E der MNCs und der CD34+ Zellen dienen die Tabellen 43 bis 47 (MNCs) bzw. 48 bis 52 (CD34+). Unter Berücksichtigung der Reinheitswerte präsentieren die Abbildungen 8 und 9 den Verlauf der CFU-GM und BFU-E der MNCs und der CD34+ Zellen.

Tabelle 43: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 15 MNCs	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
03	45,5	1,00*10 ⁴	0,46			
07	35	0,50*10 ⁴	0,7			
09	25,5	1,00*10 ⁴	0,26			
13	43	0,50*10 ⁴	0,86	69,5	1,00*10 ⁴	0,7
15	40,5	0,50*10 ⁴	0,81	24	1,00*10 ⁴	0,24
21	28	0,50*10 ⁴	0,56	35,5	1,00*10 ⁴	0,36

HSC 15 MNCs	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
03	0,5	1,00*10 ⁴	0,01			

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 03-21: Passagen [Wochen];

$$w = \frac{k_1}{c} * 100$$

Tabelle 44: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 16 MNCs	BFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	1,5	0,50*10 ⁴	0,03			
04	50,5	0,50*10 ⁴	1,01			
05	27	0,50*10 ⁴	0,54			
10	40	0,25*10 ⁴	1,6	20	0,50*10 ⁴	0,4
11	10	0,25*10 ⁴	0,4	13,5	0,50*10 ⁴	0,27
13	9	0,25*10 ⁴	0,36	16,5	0,50*10 ⁴	0,33
19				30,5	0,50*10 ⁴	0,61

HSC 16 MNCs	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	2,5	0,50*10 ⁴	0,05			
04	1,5	0,50*10 ⁴	0,03			

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k_1 : Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-19: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 45: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 17 MNCs	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
8	46	0,25*10 ⁴	1,84			
10	28,5	0,25*10 ⁴	1,14			
11	25	0,25*10 ⁴	1,0	56,5	0,50*10 ⁴	1,13
12	40,5	0,25*10 ⁴	1,62			
14	28	0,25*10 ⁴	1,12			
16	38,5	0,25*10 ⁴	1,54			
18	20	0,25*10 ⁴	0,8	32,5	0,50*10 ⁴	0,65
20	36,5	0,25*10 ⁴	1,46			
22				41	0,50*10 ⁴	0,82

HSC 17 MNCs	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
8	18	0,25*10 ⁴	0,72			
10	1	0,25*10 ⁴	0,04			
11	2,5	0,50*10 ⁴	0,1			

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k_1 : Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 08-22: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 46: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 19 MNCs	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
01	67,5	0,50*10 ⁴	1,35			
03	54,5	0,50*10 ⁴	1,09			
06	21	0,50*10 ⁴	0,42			
08	30,5	0,50*10 ⁴	0,61	61	1,00*10 ⁴	0,61

HSC 19 MNCs	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
01	9,5	0,50*10 ⁴	0,19			
03	1	0,50*10 ⁴	0,02			

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 01-08: Passagen [Wochen];

$$w = \frac{k_1}{c} * 100$$

Tabelle 47: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der MNCs der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 21 MNCs	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
03	66	0,50*10 ⁴	1,32			

HSC 21 MNCs	BFU-E					
			w	Ø	c	w
03	1	0,50*10 ⁴	0,02			

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k_1 : Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], MNCs: mononukleäre Zellen, w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 03: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 48: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC15 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 15 CD34+	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
09	9,5	2,00*10 ³	0,48			
13	37,5	2,00*10 ³	1,88			
16	31	2,00*10 ³	1,55			
21	37,5	2,00*10 ³	1,88			
25	18,5	2,00*10 ³	0,93			

HSC 15 CD34+	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
09	0	2,00*10 ³	0			

HSC 15: hämatopoietische Stammzellen der Probe 15, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 09-25: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 49: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC16 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 16 CD34+	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	49	0,25*10 ³	19,6			
03	10	0,25*10 ³	4,0	19,5	0,50*10 ³	3,9
10	21	1,00*10 ³	2,1			
11	18	1,00*10 ³	1,8	11	2,00*10 ³	0,55
13	9,5	1,00*10 ³	0,95	16,5	2,00*10 ³	0,83

HSC 16 CD34+	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	13,5	0,25*10 ³	5,4			
03	0,5	0,50*10 ³	0,1			

HSC 16: hämatopoietische Stammzellen der Probe 16, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM: Kolonieanzahl CFU-GM, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-13: Passagen [Wochen];

$$w = \frac{k_1}{c} * 100$$

Tabelle 50: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC17 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 17 CD34+	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	56,5	0,15*10 ³	37,67			
04	50	0,50*10 ³	10,0			
07	23,5	0,50*10 ³	4,7			
09	25	0,50*10 ³	5,0	37	1,00*10 ³	3,7
11	42,5	0,50*10 ³	8,5			
13	22	0,50*10 ³	4,4			
15	23,5	0,50*10 ³	4,7			

HSC 17 CD34+	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	17,5	0,15*10 ³	11,67			
04	7	0,50*10 ³	1,4			
07	0,5	0,50*10 ³	0,1			

HSC 17: hämatopoietische Stammzellen der Probe 17, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-15: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 51: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC19 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 19 CD34+	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	8,5	0,125*10 ³	6,8	20,5	0,25*10 ³	8,2
03	4,5	0,25*10 ³	1,8	13,5	0,50*10 ³	2,7
06	8,5	0,50*10 ³	1,7			
08	23	2,00*10 ³	1,15			

HSC 19 CD34+	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
0	8,5	0,125*10 ³	6,8			
03	0,5	0,25*10 ³	0,2	0,5	0,50*10 ³	0,1

HSC 19: hämatopoietische Stammzellen der Probe 19, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 0-08: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

Tabelle 52: Wiederfindungswerte der CFU-GM und der BFU-E der CD34+ der HSC21 zur Darstellung der Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension] der CFU-GM und BFU-E unter Berücksichtigung unterschiedlicher Verdünnungsschritte

HSC 21 CD34+	CFU-GM					
	Ø	c	w	Ø	c	w
03	5,5	0,25*10 ³	2,2	13,5	0,50*10 ³	2,7
07	3,5	0,25*10 ³	1,4	13,5	0,50*10 ³	2,7

HSC 21 CD34+	BFU-E					
	Ø	c	w	Ø	c	w
03	0	0,25*10 ³	0	0	0,50*10 ³	0

HSC 21: hämatopoietische Stammzellen der Probe 21, BFU-E: Kolonieanzahl der BFU-E, c: Konzentration [Zellzahl/ml Zellsuspension], CD34+: CD34-positive Zellen, CFU-GM: Kolonieanzahl der CFU-GM, k₁: Anzahl der primären Kolonien [Kolonie >40 Zellen/ml Zellsuspension], w: Wiederfindungswert [%], Ø: durchschnittliche Anzahl der Kolonien; 03-07: Passagen [Wochen]; $w = \frac{k_1}{c} * 100$

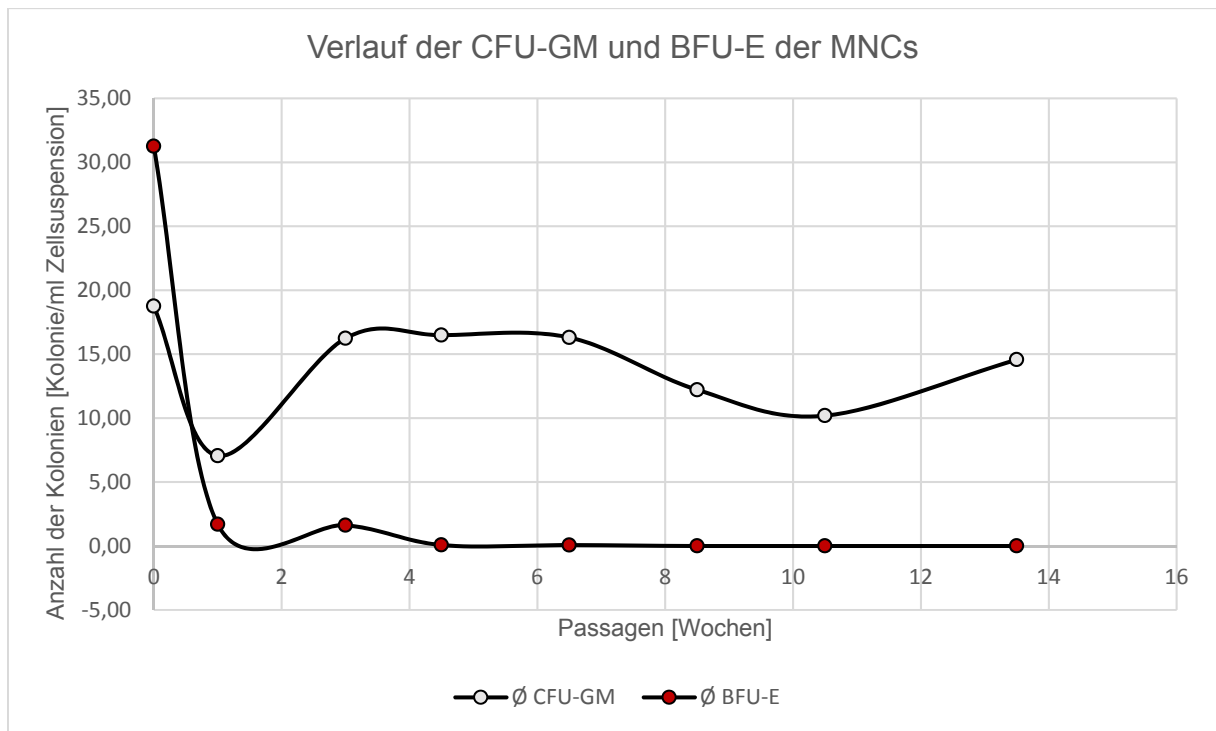


Abbildung 8: Verlauf der CFU-GM und BFU-E der MNCs der HSC 15/16/17/19/21 unter Berücksichtigung der Wiederfindungs- und Reinheitswerte in Anlehnung an die Tabellen 43 bis 47 und die Reinheit der Proben (siehe Tabelle im Anhang); p: Reinheit der Probe [%], r: Reinheitswert [%], w: Wiederfindungswert [%]; $r = \frac{w}{p} * 100$

Die Kolonienanzahl der CFU-GM der MNCs beträgt zu Beginn der Passagierung (P0) im Durchschnitt 18,75 Kolonien pro ml Zellsuspension. Nach der ersten Woche (P1) fällt die Anzahl der weißen Kolonien auf 7,05 zurück. Zwischen den Passagen 4 und 5 steigt die Kolonienanzahl auf durchschnittlich 16,48 an und beträgt nach etwa 3 Monaten, am Ende der Passagierung (P13,5), 14,57 Kolonien pro ml Zellsuspension.

Die Kolonienanzahl der BFU-E der MNCs beträgt zu Beginn der Passagierung (P0) im Durchschnitt 31,25 Kolonien pro ml Zellsuspension. Nach der ersten Woche (P1) fällt die Anzahl der roten Kolonien auf 1,69 zurück. Zwischen den Passagen 4 und 5 beträgt sie 0,07 und ab Passage 8,5 sind keine Kolonien mehr nachweisbar.

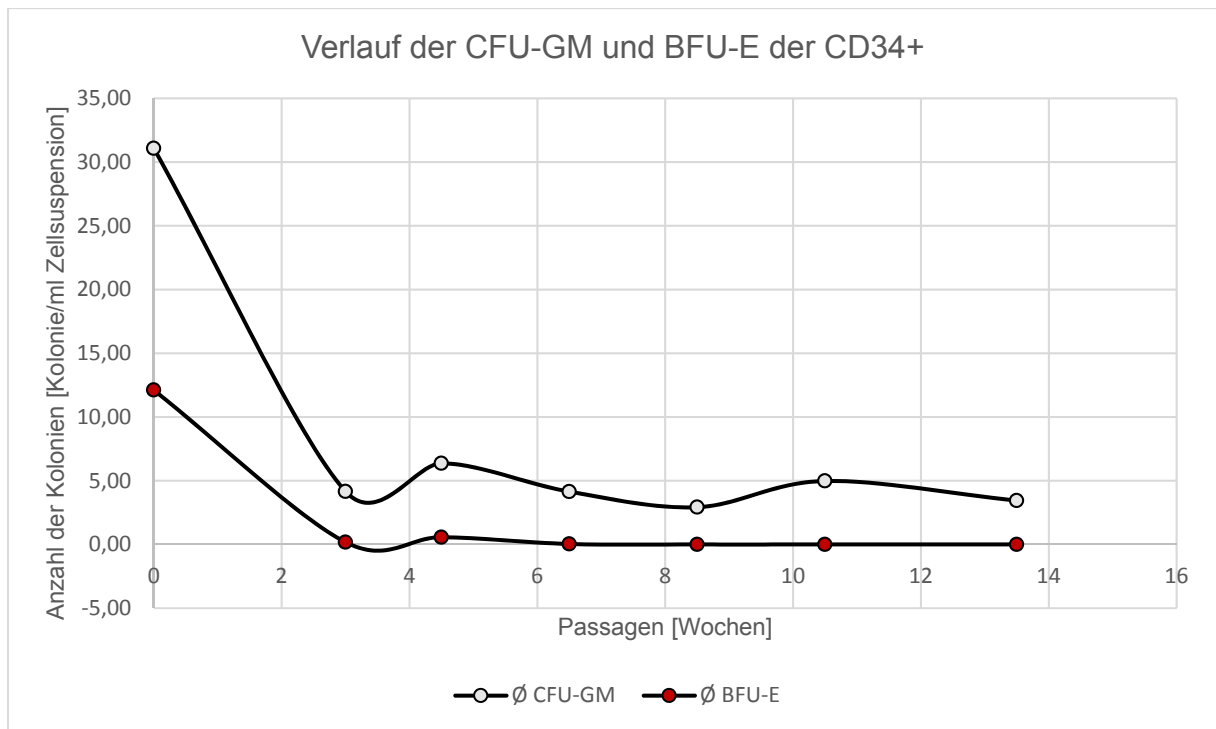


Abbildung 9: Verlauf der CFU-GM und BFU-E der CD34+ der HSC 15/16/17/19/21 unter Berücksichtigung der Wiederfindungs- und Reinheitswerte in Anlehnung an die Tabellen 48 bis 52 und die Reinheit der Proben (siehe Tabelle im Anhang); p: Reinheit der Probe [%], r: Reinheitswert [%], w: Wiederfindungswert [%]; $r = \frac{w}{p} * 100$

Die Kolonienanzahl der CFU-GM der CD34+ Zellen beträgt zu Beginn der Passagierung (P0) im Durchschnitt 31,08 Kolonien pro ml Zellsuspension. Nach der dritten Woche (P3) fällt die Anzahl der weißen Kolonien auf 4,16 zurück. Zwischen den Passagen 4 und 5 steigt die Kolonienanzahl auf 6,36 an und beträgt nach etwa 3 Monaten, am Ende der Passagierung (P13,5), 3,44 Kolonien pro ml Zellsuspension.

Die Kolonienanzahl der BFU-E der CD34+ Zellen beträgt zu Beginn der Passagierung (P0) im Durchschnitt 12,11 Kolonien pro ml Zellsuspension. Nach der dritten Woche (P3) fällt die Anzahl der roten Kolonien auf 0,18 zurück. Zwischen den Passagen 4 und 5 beträgt sie 0,57 und ab Passage 8,5 sind keine Kolonien mehr nachweisbar.

3.2.4 PROZENTUALE VERÄNDERUNG DER CFU-GM UND BFU-E

Mittels prozentualer Veränderung (Percentage Change) wird in den Tabellen 53 bis 54 und in den Abbildungen 10 bis 13 die prozentuale Abnahme der der CFU-GM und BFU-E des Primäransatzes im Laufe der Kultivierung durch Passagierung dargestellt.

Tabelle 53: Prozentuale Veränderung der CFU-GM und BFU-E der MNCs zur Darstellung der prozentualen Abnahme der weißen und roten Kolonien der MNCs [%]

Passagen	GM16	E16	GM17	E17	GM19	E19	GMØ	EØ
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-5	-36,34	-100,0	50,41	-100,0			7,03	-100,0
6-7			39,05	-100,0	-55,00	-100,0	-7,98	-100,0
8-9			42,08	-100,0	-59,42	-100,0	-8,67	-100,0
10-11	-52,45	-100,0	6,14	-100,0			-23,16	-100,0
12-15	-72,02	-100,0	43,30	-100,0			-14,36	-100,0

E16 bis E19: Prozentuale Veränderung der BFU-E der HSC 16/17/19 [%], GM16 bis GM19: Prozentuale Veränderung der CFU-GM der HSC 16/17/19 [%], Passagen [Wochen]

Tabelle 54: Prozentuale Veränderung der CFU-GM und BFU-E der CD34+ zur Darstellung der prozentualen Abnahme der weißen und roten Kolonien der CD34+ [%]

Passagen	GM16	E16	GM17	E17	GM19	E19	GMØ	EØ
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	-83,21	-99,20	-94,06	-98,40	-65,26	-97,05	-80,88	-98,21
4-5	-85,93	-100,0	-76,54	-89,37			-81,23	-94,69
6-7			-88,73	-99,20	-73,36	-100,0	-81,05	-99,60
8-9			-89,09	-100,0	-83,25	-100,0	-86,17	-100,0
10-11	-92,08	-100,0	-77,97	-100,0			-85,02	-100,0
12-15	-96,32	-100,0	-88,92	-100,0			-92,62	-100,0

E16 bis E19: Prozentuale Veränderung der BFU-E der HSC 16/17/19 [%], GM16 bis GM19: Prozentuale Veränderung der CFU-GM der HSC 16/17/19 [%], Passagen [Wochen]

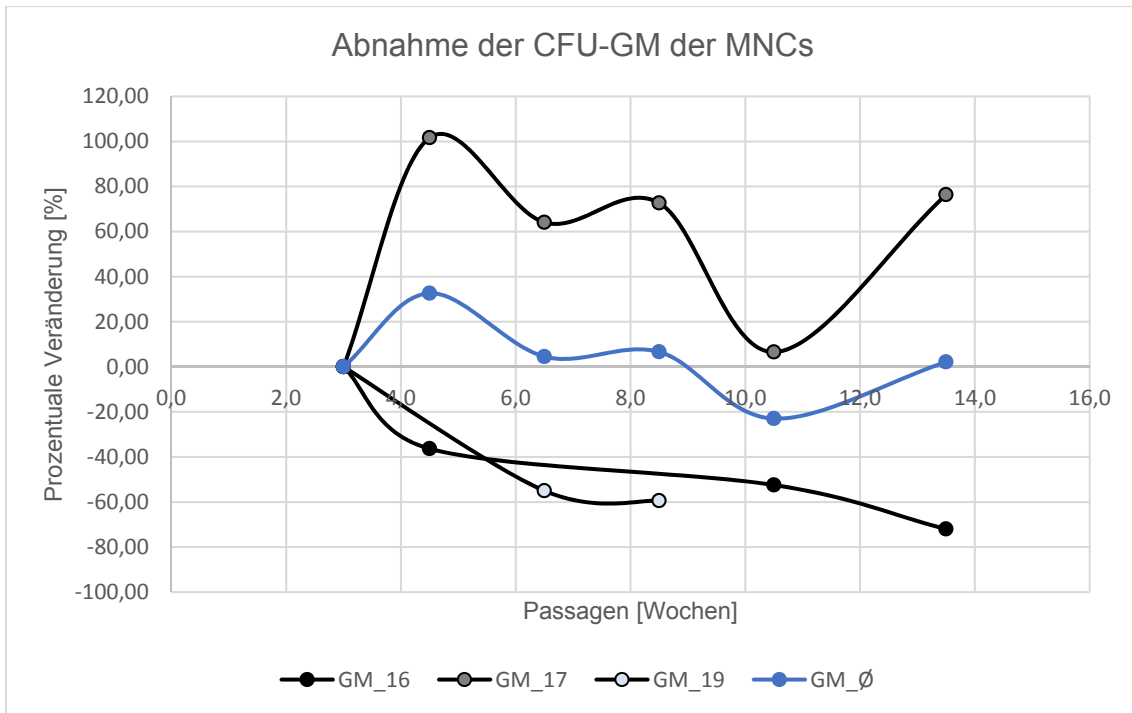


Abbildung 10: Abnahme der CFU-GM der MNCs der HSC 16/17/19 [%]

Der Verlauf der weißen Kolonien der MNCs ist zu Beginn (von P3 auf P4,5) durch eine Zunahme von 32,66% gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf beträgt die prozentuale Veränderung +4,53% bei Passage 6,5 und steigt bis Passage 8,5 auf +6,62% an. Innerhalb der folgenden 2 Wochen (P10,5) fällt die Anzahl der weißen Kolonien rasant auf -22,96% zurück. Am Ende der Passagierung, nach 3 Monaten (P13,5), nimmt die Kolonienanzahl der CFU-GM der MNCs auf +2,17% erneut wieder zu.

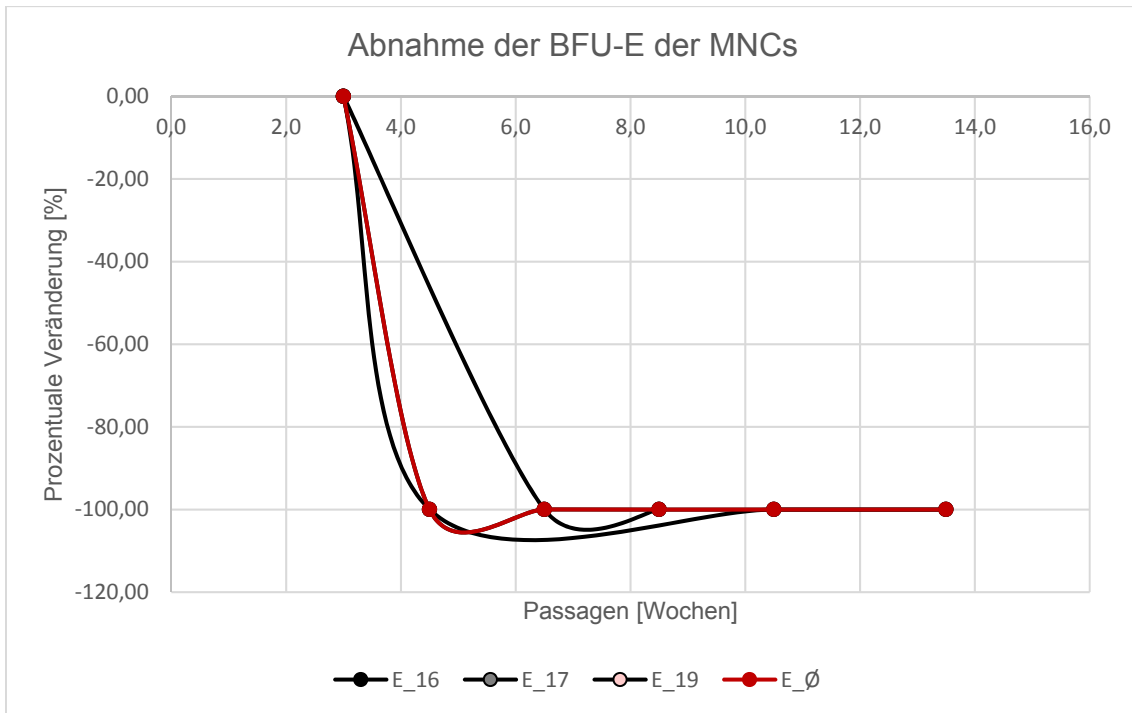


Abbildung 11: Abnahme der BFU-E der MNCs der HSC 16/17/19 [%]

Die rasante Abnahme der roten Kolonien führt innerhalb des ersten Monats (von P3 auf P4,5) zu einer Auslöschung der BFU-E der MNCs.

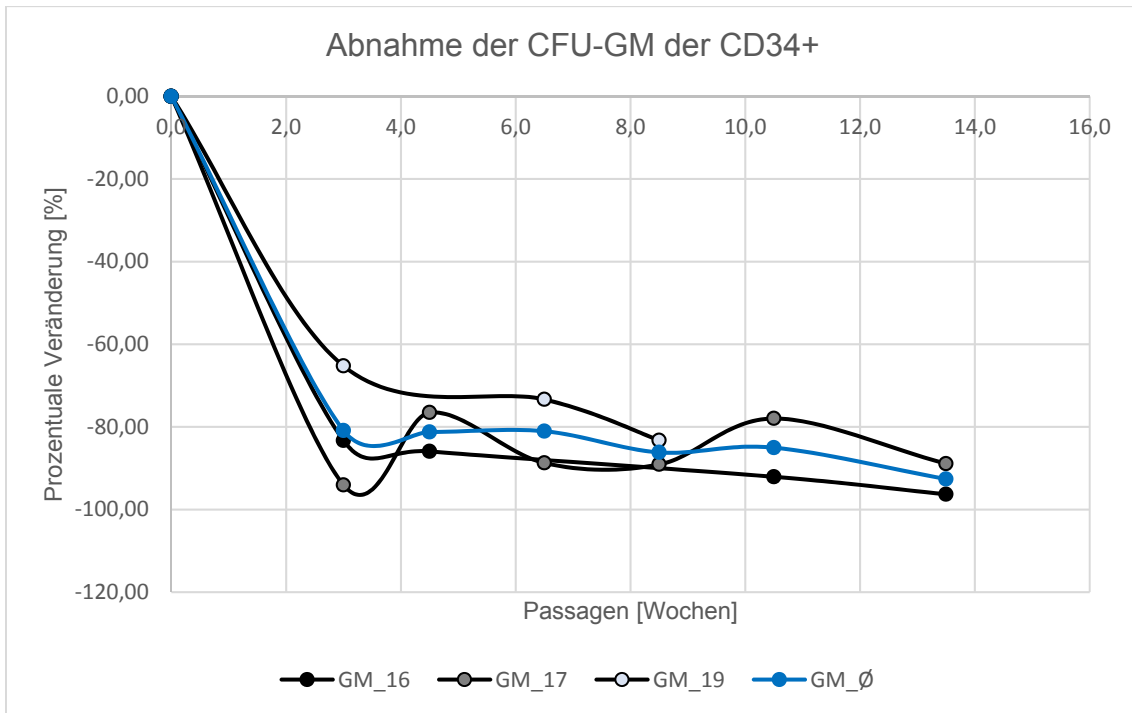


Abbildung 12: Abnahme der CFU-GM der CD34+ der HSC 16/17/19 [%]

Der Verlauf der weißen Kolonien der CD34+ Zellen ist zu Beginn (von P0 auf P3) durch eine Abnahme von 80,88% gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf beträgt die prozentuale Veränderung -81,05% bei Passage 6,5 und nimmt bis Passage 8,5 auf -86,17% ab. Am Ende der Passagierung, nach 3 Monaten (P13,5), fällt die Kolonienanzahl der CFU-GM der CD34+ Zellen auf -92,62% zurück.

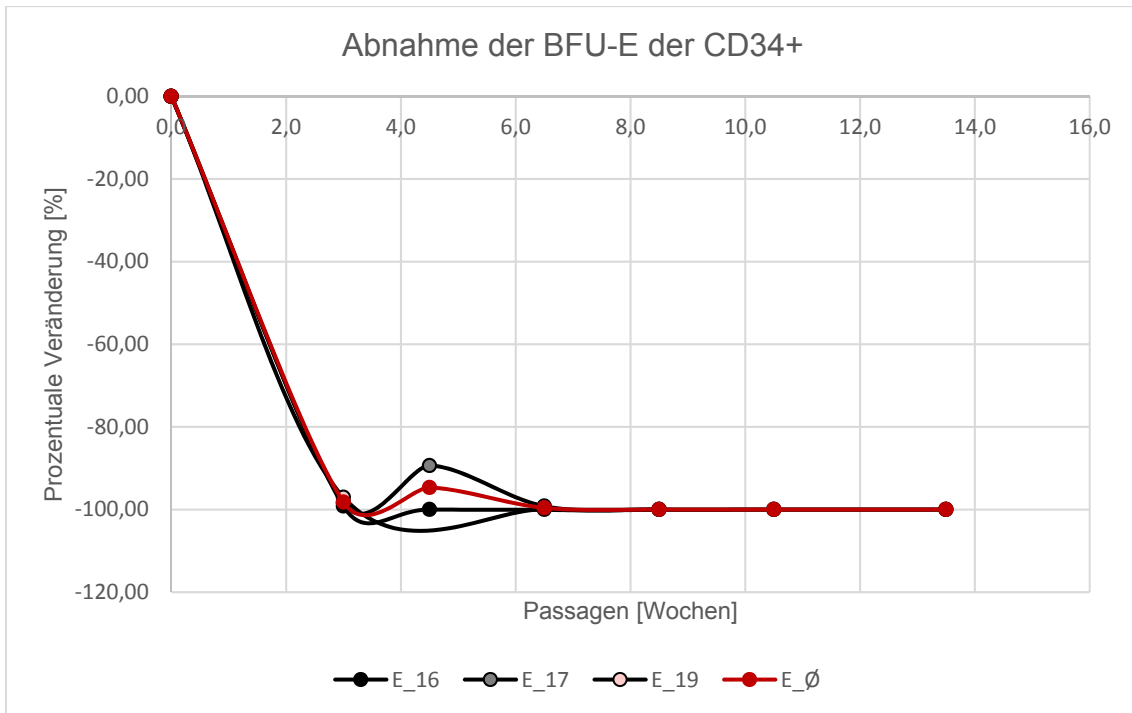


Abbildung 13: Abnahme der BFU-E der CD34+ der HSC 16/17/19 [%]

Der Verlauf der roten Kolonien der CD34+ Zellen ist zu Beginn (von P0 auf P3) durch eine Abnahme von 98,21% gekennzeichnet. Die Kolonienanzahl der BFU-E steigt bei Passage 4,5 auf eine prozentuale Veränderung von -94,69% an und fällt innerhalb der folgenden 2 Wochen auf -99,6% (P6,5). Ab der Passage 8,5 sind die BFU-E der CD34+ Zellen nicht mehr in der Lage, Kolonien zu bilden.

Innerhalb von einem Monat (bei Passage 4,5) verzeichnen die CFU-GM der CD34+ Zellen eine Abnahme der Kolonienbildung von 81,23%, wohingegen die BFU-E der CD34+ Zellen eine Abnahme von 94,69% aufweisen und die roten Kolonien der MNCs bereits teilungsunfähig sind. Nach 1,5 Monaten (bei Passage 6,5) verzeichnen die CFU-GM der CD34+ Zellen eine Abnahme der Kolonienbildung von 81,05%, wohingegen die BFU-E der CD34+ Zellen eine Abnahme von 99,6% aufweisen. Im Gegensatz dazu nimmt die Teilungsfähigkeit der weißen Kolonien der MNCs innerhalb von einem Monat auf +32,66% zu und nach 1,5 Monaten auf +4,53% ab.

4 DISKUSSION

Potenzielle autologe und allogene Therapieansätze mit aus Nabelschnurblut isolierten Stammzellen stehen vermehrt unter wissenschaftlichen und ethischen Aspekten in Diskussion. Daher wurde in dieser Studie der Fokus auf die Langzeitkultivierung der UCB-HSPCs gelegt, um weitere Erkenntnisse über ihr Wachstumsverhalten und ihre Proliferationskapazität zu erlangen.

Aufgrund des limitierenden Faktors der geringen Stammzellzahl und des damit einhergehenden verzögerten Engraftments im Rahmen der CBTs wurde in den letzten Jahrzehnten Hoffnung in die Entdeckung optimaler Kulturbedingungen zur *in vitro* Expansion und Beeinflussung der Homing-Fähigkeit der UCB-HSPCs gesteckt. Einen möglichen Ansatz zur Verbesserung der *ex vivo* Vermehrung von aus Nabelschnurblut gewonnenen HSPCs stellen der Einsatz bestimmter Zytokin-Kombinationen (58, 59) und „small molecules“ (60) sowie die gezielte Beeinflussung spezifischer Signalwege (80) dar. 2008 entwickelten Zhang et al. durch Untersuchung eines Mediums aus verschiedenen Wachstumsfaktoren wie SCF, TPO, FGF-1, ANGPTL-5 und IGFBP2 eine Methode zur Optimierung der Zellkultivierung. (58) Auch Fan et al. schafften 2014 über mehrere Verdünnungsstufen hinweg einen Ansatz zur verbesserten *in vitro* Expansion. (59) Interessanterweise beobachteten sie, dass die Expansion der HSPCs mit steigender Zytokindosis (von ANGPTL-3, IGF-2, IGFBP-1 und IGFBP-2) abnahm. Kürzlich entdeckten Bari et al. die potente Wirkung eines Moleküls, C7. (60) In ihrer 2018 veröffentlichten Studie konnten sie zeigen, dass C7 zu einer signifikant stärkeren Expansion führte. Im Vergleich zur Zytokin-Kontrollgruppe wurde bei Zugabe des Moleküls eine 3,7-fach erhöhte und in Kombination mit den Zytokinen SCF, TPO, FLT-3L und IGFBP-2 sogar eine 4,7-fach erhöhte Zellexpansion beobachtet. Das Forschungsteam rund um Delaney berichtete 2010, dass die Kultivierung mit Wachstumsfaktoren in Gegenwart von Notch im Vergleich zur Zytokin-Kontrollgruppe in eine signifikant stärkere Expansion der HPCs resultierte (222 ± 57 -fache vs. 68 ± 30 -fache Expansion). (80) So scheinen die Konzentration und die Kombination gewisser Faktoren von entscheidender Rolle für die *in vitro* Expansion der UCB-HSPCs zu sein. Auch in dieser Studie wurde in Anlehnung an

Gammaitoni et al. die stromafreie Kultivierungsmethode unter Zugabe der Zytokine SCF (50 ng/ml), TPO (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml) und Flt3/Flk2 (50 ng/ml) verwendet. (81)

Neben der stromafreien Kultivierungsmethode besteht die Möglichkeit zur Co-Kultivierung mit mesenchymalen Stromazellen (82) oder mit aus mesenchymalen Stromazellen generierten Osteoblasten (M-OSTs). (83) Dumont et al. beobachteten 2014, dass sich eine Co-Kultivierung mit M-OSTs positiv auf die Expansion der HSCPs und ihr Engraftment auswirkte. (83) Diese führte zur verstärkten Expansion der CD34+ Zellen und zum vermehrten Expressieren der Oberflächenmarker CXCR-4 und LFA-1 (Lymphozyten-Funktion-assoziiertes Antigen 1), welche für das Homing in die SCN von Bedeutung sind. De Lima et al. beobachteten 2012 nach einer 14-tägigen Co-Kultivierung mit mesenchymalen Stromazellen eine etwa 30-fache Vermehrung der CD34+ Zellen und eine Steigerung der CFU um den Faktor 17,5 (82). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mesenchymale Stromazellen ähnlich der SCN Signale bereitstellen, welche die Proliferation der UCB-HSPCs und ihr Engraftment unterstützen. Diese Methode wurde in der vorliegenden Diplomarbeit nicht zusätzlich untersucht. Es wäre von Interesse, ob die gezeigte Einschränkung der Proliferationskapazität auch auf dieses Kultivierungsmodell übertragbar ist.

Die in vivo Untersuchungen von Bari et al. (60) und Dumont et al. (83) wurden am Mausmodell durchgeführt und gingen im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit einem erhöhten Engraftment einher. Die in Gegenwart von C7 expandierten Zellen wurden in subletal bestrahlte Mäuse transplantiert. (60) Diese wiesen am Tag 12 ein etwa doppelt- bis dreifach erhöhtes Engraftment als die Kontrollgruppen auf, welche in Abwesenheit von C7 expandierte Zellen erhalten hatten. Delaney et al. (80) und de Lima et al. (82) gingen einen Schritt weiter und überprüften die kultivierten Zellen an Patienten/-innen. Die im stromafreien Medium, in Gegenwart von Notch expandierten CD34+ Zellen wurden 10 Patienten/-innen transplantiert, die eine nicht manipulierte und eine in vitro generierte Nabelschnurblut-Einheit erhalten hatten. (80) Innerhalb von 7 bis 17 Tagen wurde eine neutrophile Erholung beobachtet. Diese rasche Bereitstellung ausgereifter Blutzellen, wie z.B. der neutrophilen Granulozyten, ist in der frühen Phase des Engraftments von

Bedeutung. Doch es stellt sich die Frage, ob diese HSPCs neben einer schnellen Erholung der Blutzellen auch eine dauerhafte sichern. (84, 85) Weitere klinische Erkenntnisse zur stromahaltigen Kultivierung lieferten de Lima et al. (82) Ihre Untersuchungen zeigten, dass sich eine Transplantation der mit mesenchymalen Stromazellen co-kultivierten Zellen positiv auf das Engraftment der Patienten/-innen auswirkte. Im Vergleich zur CBT von nicht expandierten HSPCs wurde eine schnellere Erholung der neutrophilen Zellen (15 vs. 24 Tagen) verzeichnet. Die Todesursachen in der Gruppe, welche jeweils eine nicht manipulierte und eine expandierte Nabelschnurbluteinheit erhalten hatte, waren innerhalb der ersten 12 Monate in 4 Fällen Relapse (~13% der Patienten/-innen), in 4 weiteren GvHD, in 2 durch Chemotherapie induzierte Toxizität (~6,5%) und in 11 Infektionen (~35%). Etwa zwei Drittel der Patienten/-innen waren verstorben. (82) Unter diesen Kulturbedingungen wurden ebenfalls eine signifikante Expansion der HSPCs und in weiterer Folge ein schnelleres Engraftment verzeichnet. Aufgrund des Outcomes darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass anscheinend jene Zellen, welche für eine langfristige Repopulation verantwortlich wären (LT-HSCs), in vitro dezimiert wurden. In der vorliegenden Diplomarbeit konnte beobachtet werden, dass die Proliferationskapazität der UCB-HSPCs im Laufe der Passagierung abnahm. Es ist zu diskutieren, dass eben diese Abnahme der Proliferationskapazität bzw. der Qualität der Zellen einen ausschlaggebenden Faktor für das langfristige Überleben transplantierte Patienten/-innen darstellt.

Eine weitere Strategie zur Beeinflussung der in vitro Expansion der UCB-HSPCs stellt die Verwendung bestimmter hämatopoietischer Populationen dar. (86) Flores-Guzman et al. verglichen 2013 fünf verschiedene Zellpopulationen miteinander: MNCs, CD34+CD38+ und CD34+CD38- Zellen sowie aufgereinigte CD34+CD38+ und aufgereinigte CD34+CD38- Zellen. Während in der zweiten Woche eine Expansion der MNCs kaum feststellbar war, wiesen die anderen Zellfraktionen eine signifikante Expansion auf. Auch in Bezug auf die Progenitorzellen schnitten die anderen vier Populationen besser als die MNCs ab. Diese waren durch eine moderate (4-fache) Expansion der CFCs gekennzeichnet, wohingegen die CD34+CD38+ eine 26-fache, die CD34+CD38- eine 67-fache, die aufgereinigten CD34+CD38+ eine 200-fache und die aufgereinigten CD34+CD38- Zellen sogar eine 490-fache Vermehrung der CFCs verzeichneten. Unter den vier zuletzt

Genannten kennzeichneten sich die aufgereinigten Zellpopulationen durch ein signifikant höheres Expansionspotenzial als die anderen aus. Am besten schnitt die Zellfraktion ab, welche sowohl hohe CD34+-Zell-Spiegel (>98%) als auch den primitiveren Zelltyp aufwies: die aufgereinigten CD34+CD38- Zellen. (86) Unter diesen stromafreien Kulturbedingungen scheinen diese Zellen die am besten geeignete Population für eine in vitro Expansion darzustellen. Ähnliches konnte in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die roten Kolonien beobachtet werden. Während die BFU-E der MNCs nach einem Monat der Kultivierung bereits unfähig waren, Kolonien zu bilden, wiesen die BFU-E der CD34+ Zellen eine Proliferationskapazität von ca. 5% auf. Im Gegensatz dazu waren die CFU-GM der CD34+ Zellen durch eine Abnahme der Kolonienbildung von ca. 81% gekennzeichnet, wohingegen die CFU-GM der MNCs eine Zunahme auf ca. 33% aufweisen konnten. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass nur eine Probe der MNCs (HSC 17) eine Zunahme der Proliferationskapazität aufwies. Die restlichen CFU-GM der MNCs waren wie die der CD34+ Zellen durch eine Abnahme gekennzeichnet.

Einen weiteren Ansatz zur Erzielung eines besseren Engraftments stellt neben der Beeinflussung des Expansionsverhaltens der UCB-HSPCs auch die Erhöhung ihrer Homing-Fähigkeit dar. 2017 stellten Guo et al. fest, dass Glukokortikoide HSPCs dazu veranlassen, CXCR-4 vermehrt zu exprimieren. (87) Angereicherte CD34+ Zellen (zwischen 90-98%) wurden für 16 Stunden unter Zusatz von Glukokortikoiden inkubiert, in subletal bestrahlte Mäuse injiziert und führten über eine Hochregulierung von CXCR-4 zu einem verbesserten Engraftment. Hoggatt et al. beobachteten, dass auch dmPGE2, ein stabiles Derivat des Prostaglandin E2, über eine Hochregulierung von CXCR-4 eine positive Wirkung aufwies. (88) Mittels präklinischer an Primaten durchgeführter Studien bestätigte sich das „Homing-Potenzial“ von dmPGE2; (89) so dass Cutler et al. Nabelschnurblut-Einheiten, die zuvor für 120 min mit dmPGE2 inkubiert worden waren, 12 Patienten/-innen transplantierten. (90) Sie verzeichneten in ihrer 2013 veröffentlichten Studie ähnliche Ergebnisse wie Lima et al. Es kam zu einer schnelleren Erholung der neutrophilen Zellen: nach 17,5 Tagen. Allerdings verstarben auch hier fast zwei Drittel der Patienten/-innen in Folge von Relapse (3 Patienten/-innen), Komplikationen (4) und nach Suizid (1). Ähnlich wie bei Lima et al. führte die CBT,

bestehend aus einer nicht manipulierten und einer expandierten Nabelschnurblut-Einheit, im Menschen zu keinem Langzeit-Engraftment. Peled et al. beobachteten 2012, dass Nicotinamide (NAM) die Homing-Fähigkeit der UCB-HSPCs erhöhen. (91) Nach 3-wöchiger Kultivierung wurden die in vitro generierten CD34+ Zellen in subletal bestrahlte Mäuse transplantiert. Die Mäuse, welche Zellen aus der Kultur unter Zusatz von NAM erhalten hatten, zeigten ein 3-fach besseres Engraftment als die Kontrollgruppe. Die Übertragbarkeit der Beobachtungen im Mausmodell auf den Menschen müssen mit Vorsicht betrachtet werden. Während Hoggatt et al. im Rahmen sekundärer Transplantationen eine Aufrechterhaltung des Engraftments nachwies und daraus schlossen, dass dmPGE2 einen Effekt auf die LT-HSCs haben musste; konnten Cutler et al., ähnlich wie de Lima et al., in ihren klinischen Studien kein LT-Engraftment in Patienten/-innen feststellen. Dies steht wiederum mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Einklang. Mit zunehmender Passagierung wurde eine Abnahme der Kolonienbildung beobachtet. Es scheint, dass die anfängliche Proliferationskapazität im Laufe der Zeit verloren geht, oder dass in vitro jene HSPCs dezimiert werden, die für eine langfristige Repopulation fähig wären. Das weist darauf hin, dass die zahlenmäßige Vermehrung der UCB-HSPCs allein nicht ausschlaggebend ist. Diese führt zwar zu ein frühes aber lediglich transientes Engraftment.

Unabhängig von den unterschiedlichen Kultivierungsstrategien (Beeinflussung des Expansions- und des Homing-Verhaltens der UCB-HSPCs) steht zur Diskussion, welchen Benefit Patienten/-innen von in vitro expandierten HSPCs unter Berücksichtigung der Risiken haben. Denn Zellen außerhalb ihrer gewohnten Umgebung zu kultivieren und sie danach wieder in den Körper zurück zu transferieren, birgt ein gewisses Gefahrenpotenzial in sich. Bei in vitro Kultivierung von Stamm- und Progenitorzellen wurden Zellalterung und genetische Instabilität beobachtet. (92, 93) Thomay et al. stellten in der Langzeitkultur von CD34+ Zellen das Auftreten von Telomerverkürzungen, Chromosomenbrüchen und Monosomie 7 fest. (92) In der parallelen Diplomarbeit (von Martin Rinofner) wurden auch Hinweise auf Mutationen festgestellt, auf die dort näher eingegangen wird. Im Rahmen von Transplantationen wurde im Empfängerorganismus ein Wiederauftreten der Telomerverkürzung der Spenderzellen beobachtet. (94) Diese Beobachtungen sind besorgniserregend. Daher sollten in vitro kultivierte HSPCs zytogenetischen

Analysen unterzogen werden, bevor sie Patienten/-innen transplantiert werden. Dabei könnte die Telomerabnutzung nicht nur als Marker für Zellteilung, -Alterung und genetische Instabilität dienen, sondern auch einen Marker für die Langzeitergebnisse nach HCTs (94) bzw. die Proliferationskapazität der HSPCs darstellen.

Erst nach und nach wird das komplexe Zusammenspiel zwischen HSPCs und SCN erforscht (siehe Kapitel 1.1.3). Trotz der unzähligen Experimente und Studien sind die zugrunde liegenden Mechanismen, welche darüber bestimmen, ob eine Stammzelle in der G0-Phase ruht, oder ob sie in den Zellzyklus eintritt, noch nicht zu genüge geklärt. Während gewisse Signalwege die HSCs zum "self-renewing" und so zur Expansion des SC-Pools veranlassen, unterstützen andere die Differenzierung, das Loslösen von ihrer Nische und den Übertritt in den Blutkreislauf. Unter Kulturbedingungen findet die gewohnte Wechselwirkung zwischen HSPCs und SCN nicht mehr statt, denn zugrunde liegende Einflussfaktoren, wie z.B. ein niedriger Sauerstoffpartialdruck oder ein intaktes Immunsystem sind nicht mehr vorhanden. Hinweisend hierfür sind Studien, wie die von Parmar et al. (95) und Jang et al. (96) Sie stellten fest, dass jene Bereiche des Knochenmarks, welche schlechter durchblutet waren und eine geringere Sauerstoffkonzentration aufwiesen, mit HSPCs hoher Selbsterneuerungsfähigkeit angereichert waren, (95) wohingegen in Übereinstimmung damit ein hoher Gehalt an ROS (reaktiven Sauerstoffspezies) mit HSPCs geringen Selbsterneuerungspotenzials einherging. (96) Um therapeutische Ansätze für unterschiedliche hämatologische und nicht-hämatologische Krankheitsbilder zu erforschen, ist ein genaues Verständnis über das Zusammenspiel zwischen HSPCs und SCN von Bedeutung; sowie in weiterer Folge eine optimale Umsetzung der Bedingungen innerhalb des Körpers auf ein Kulturmodell. Deshalb wurde die Fragestellung in dieser Studie dahingehend gestellt, ob die Prozesse der Kultivierung Auswirkungen auf die Qualität (Self-renewal und Expansion) der HSPCs, insbesondere der CFU-GM und BFU-E, haben. Die Hypothese war, dass im Langzeitkulturmodell aus Nabelschnurblut gewonnene HSPCs im Verlauf der Passagierung durch verschiedene Mechanismen in ihrer Zellexpansion (Proliferationskapazität) abnehmen. Im Gesamten zeigte sich, mit Ausnahme der CFU-GM der MNCs, eine Abnahme der Proliferationskapazität mit zunehmender

Passagierung. Diese war bei den roten Kolonien stärker ausgeprägt als bei den weißen und ging letztlich mit einem Verlust der Kapazität, Kolonien zu bilden, einher. Nach 1,5 Monaten (Passage 6,5) verzeichneten die CFU-GM der CD34+ Zellen eine Abnahme der Kolonienbildung von ca. 81%; wohingegen die BFU-E der CD34+ Zellen eine Abnahme von >99% aufwiesen und die roten Kolonien der MNCs bereits mit Passage 4,5 die Fähigkeit, BFU-E zu bilden, verloren hatten. Es scheint, dass die Zellen außerhalb ihrer gewohnten Umgebung bzw. unter dem Einfluss von ROS einem schnelleren Alterungsprozess ausgesetzt sind, der sich in einer Abnahme der Proliferationskapazität äußert. Mantel et al. beobachteten in ihrer Arbeit, dass eine kurzzeitige Einwirkung von Umgebungssauerstoff (EPHOSS, Extra Physiologic Oxygen Shock/ Stress) zu einer Verringerung der LT-HSCs führte, auch wenn die Isolierung und weitere Verarbeitung der Stammzellen unter natürlichen Bedingungen (Hypoxie, 3% O₂) stattgefunden hatte. (97) Nicht nur die aus Knochenmark sondern auch die aus Nabelschnurblut isolierten Stammzellen waren von diesem Phänomen betroffen. UCB-HSPCs, welche in einer hypoxischen Kammer kultiviert wurden, wiesen im Vergleich zu den unter Sauerstoff kultivierten eine etwa 3-fach höhere Erholungsrate auf. (97) Die Kulturen dieser Langzeitstudie wurden in keiner hypoxischen Kammer herangezüchtet. Das kann einen möglichen Erklärungsansatz für die Proliferationsabnahme der CFU-GM und dem Auslöchen der BFU-E darstellen. Bereits durch bekannte Studien wie die von Naka et al. besteht die Theorie des Alterns von Zellen durch Sauerstoff bzw. übermäßig hohe intrazelluläre ROS-Spiegel; (98) was parallel mit einer Herunterregulierung der Expansion der CD34+ Zellen und der MNCs zu erklären wäre. Es scheint, dass HSPCs außerhalb ihrer gewohnten hypoxischen Umgebung in der SCN bzw. unter dem Einfluss von hohem Sauerstoffpartialdruck in der in vitro Kultivierung einem schnelleren Alterungsprozess ausgesetzt sind, von welchem v.a. die roten Zellreihen betroffen waren.

Die Abwesenheit von EPO stellt einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für die rasante Abnahme der BFU-E in Kultur dar. Während in den Primäransätzen der vorliegenden Diplomarbeit EPO enthalten war, wurde der Langzeitkultur zwar TPO aber kein EPO zusetzt. Dabei trat zum Vorschein, dass die Proliferationsfähigkeit der roten Kolonien stärker abnahm als die der weißen und sogar mit einem Verlust der Kolonienbildung einherging. Während die Proliferationskapazität der CFU-GM

der CD34+ Zellen von Passage 0 auf Passage 3 um ca. 81% zurück ging, verzeichneten die BFU-E von Anfang an einen Abfall von rund 98%. Ab der Passage 8,5 waren die BFU-E der CD34+ Zellen nicht mehr in der Lage, Kolonien zu bilden, wohingegen die Kolonienanzahl der CFU-GM über die Passage 12 hinaus noch erhalten blieb. Auch der Verlauf der BFU-E der MNCs war durch eine rasante Abnahme gekennzeichnet: diese waren bereits ab der Passage 4,5 nicht mehr in der Lage, rote Kolonien zu bilden. Die CFU-GM der MNCs verzeichneten zu Beginn (von Passage 3 auf Passage 4,5) eine Zunahme von ca. 33% und wiesen auch über die Passage 12 hinaus eine Proliferationsfähigkeit auf.

Dircio-Maldonado et al. verglichen in ihrer kürzlich veröffentlichten Studie frisch aus Nabelschnurblut isolierte Stammzellen mit den in vitro expandierten. (99) Ihre Ergebnisse zeigten, dass sich die HSCs trotz ihres identischen Phänotyps in ihrer Funktion unterschieden. Frisch isolierte Zellen wiesen während der gesamten Kultur LTC-ICs auf, wohingegen die in Kultur vermehrten Zellen eine abrupt abnehmende Anzahl an LTC-ICs und eine ausgeprägte abnehmende Tendenz der roten Vorläuferzellen zeigten. Nach 20 Tagen der Kultivierung waren unter den expandierten HSCs ebenfalls kaum rote Kolonien nachweisbar. Zusätzlich fand man keine multipotenten Vorläuferzellen. Des Weiteren wurde in dieser Studie beobachtet, dass die funktionellen Unterschiede mit veränderten Genexpressionen korrelierten. Über 500 Gene wurden unterschiedlich exprimiert. Signifikant hoch reguliert waren die Signalwege für myeloide Differenzierung, Leukozyten-Aktivierung, Zellzyklus, Apoptose und Chromatin-Remodellierung. (99)

Aus Nabelschnurblut gewonnenen HSPCs bieten gewisse Vorteile, z.B. geringere Rate an Abstoßungsreaktionen und Komplikationen wie GvHD. (siehe Kapitel 1.2) Auch wenn versucht wird, den limitierenden Faktor der geringen Stammzellzahl mittels Transplantation doppelter Nabelschnurbluteinheiten (66, 67) und durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen zu umgehen, dürfen die aktuellen Schwierigkeiten nicht außer Acht gelassen werden. Denn zusammenfassend steht fest, dass trotz technischen Fortschritts und neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse im Bereich der HSPCs und ihrer Kultursysteme, keine Kultivierungsmethode adäquat ausgereift ist, um UBC-HSPCs stabil zu warten oder zu expandieren. Neben nicht ausreichend vorhandener Langzeitstudien kommt der geringe klinische Einsatz der CBT hinzu. Während BMT und PBCT mit Erfolg zur Therapie

hämatologischer und nicht-hämatologischer Erkrankungen wie solider Tumoren eingesetzt werden, finden v.a. autologe CBTs in der Praxis kaum Anwendung. Aus dem Report der European Society for Blood and Marrow Transplant (EBMT) geht hervor, dass CBTs mit ca. 1% weitaus seltener als andere hämatopoetischen Stammzelltransplantationen Anwendung finden. (69) Im Jahr 2016 wurden in 49 Ländern 43.636 HCTs bei 39.313 Patienten/-innen durchgeführt. Die Hauptindikationen dafür stellten mit ca. 65% Erkrankungen des lymphatischen Formenkreises dar. Etwa 24% der Patienten/-innen waren an myeloischen, ca. 6% an nicht malignen Erkrankungen und ca. 4% an soliden Tumoren erkrankt. Insgesamt wurden 25.995 autologe (59,57%) und 17.641 allogene (40,43%) HCTs durchgeführt. Weniger als 1,07% der Patienten/-innen erhielten aus Nabelschnurblut gewonnene HSCs. Lediglich eine der 39.313 Personen empfing eine autologe CBT (0,0023%). Auch unter den Patienten/-innen, die Nabelschnurblut von Verwandten erhalten hatten, waren weniger als 0,17% zu verzeichnen. Demnach besteht im Falle der CBTs ein höherer Einsatzbedarf für allogene als autologe Transplantationen. Denn gerade bei autologen und bei Transplantationen eineiiger Zwillinge fällt der Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL), eine erwünschte immunologische Abwehrreaktion des Stammzelltransplantates gegen Leukämiezellen, weg. (62) Mediziner/-innen wie Dr. Michael Sullivan, Professor für Kinderheilkunde an der medizinischen Universität Melbourne, wiesen auf den geringen klinischen Einsatz autologer CBTs hin. (100) Allein die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an einer lebensbedrohlichen Krankheit zu erkranken und diese mit eigenen Stammzellen zu behandeln, liege zwischen 1:10.000 und 1:200.000. Die Indikationen zur autologen Transplantation stellen in Anhängigkeit von Krankheitsgrad und Alter gewisse Formen der Lymphome, der akuten myeloischen Leukämie und der soliden Tumore, wie Neuroblastome, dar. (101) Wobei in den meisten Fälle die Erkrankung auch mit einer allogenen HCT therapiert werden kann. Der erste berichtete Fall einer autologen CBT stammt aus dem Jahr 1999. (102) Bei einem 1-jährigen Mädchen mit einem Neuroblastom im Stadium 4 wurde eine Behandlung mit autologen HSCs aus einer privaten Nabelschnurbank durchgeführt. Vierzehn Monate nach der Transplantation wies das Kind ein normales Blutbild auf und war vollständig von seiner Krankheit geheilt. Der erste Bericht einer autologen CBT zur Behandlung eines an akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankten Kindes wurde 2006 veröffentlicht. (103)

Dabei handelte es sich um ein 3-jähriges Mädchen, welches zehn Monate nach der Diagnose einen isolierten Rückfall im zentralen Nervensystem erlitten hatte. Nach einer systemischen Chemotherapie sowie einer myeloablativen Chemo- und Strahlentherapie wurde das Kind mit HSCs aus seinem eigenen Nabelschnurblut behandelt. Zwanzig Monate nach der autologen CBT wies das Mädchen eine vollständige Remission auf. Jedoch sind der Öffentlichkeit keine Berichte über den weiteren Verlauf des Mädchens vorliegend. Von privaten Nabelschnurbanken unkritisch beworben, stieß dieser Fall in der Wissenschaft auf Kritik und wurde u.a. von Urban et al. kritisiert. (104)

Die autologe CBT spielt nach wie vor weder bei der Erstdiagnose noch beim Rezidiv einer ALL im Kindesalter eine Rolle. (100, 101) Sie hat nachweislich keinen größeren Nutzen gegenüber einer intensivierten Chemotherapie oder einer allogenen Transplantation von Knochenmark und Nabelschnurblut. Die Heilungsrate der an ALL erkrankten Kinder beträgt ohne Stammzelltransplantation und ohne Radiotherapie ca. 94%. (105) Von den Kindern, die einen Rückfall erleiden, wird etwa die Hälfte mit einer Chemo- und Radiotherapie und die andere mit einer allogenen Stammzelltransplantation behandelt. (100) Das ergibt für an Leukämie erkrankte Kinder eine Transplantationswahrscheinlichkeit von ca. 1:22:000. Zusätzlich sprechen das Fehlen des GvL-Effekts und das potenzielle Risiko eines Wiederauftretens der Krankheit aufgrund pre-leukämischer Stammzellklone gegen eine autologe CBT.

Neben diesen wissenschaftlichen und medizinischen Aspekten spielen auch die ethischen eine nicht außer Acht lassende Rolle. V.a. die irreführenden Aussagen privater Nabelschnurbanken werden vermehrt diskutiert. Frau Prof. Loane Skene, Professorin für Recht an der juristischen Fakultät in Melbourne, forderte in ihrem Schreiben realistische Aussagen hinsichtlich des Potenzials der aus Nabelschnurblut gewonnenen Stammzellen, ohne Übertreibung und mit Erwähnung möglicher Risiken ihrer Gewinnung. (106) In Folge der geäußerten Bedenken hinsichtlich kommerzieller Nabelschnurbanken wurden diverse Gutachten (64) und Richtlinien (107) verabschiedet. Das EGE-Gremium gab bereits 2004 ein Gutachten über die ethischen Aspekte der Nabelschnurblutbanken heraus. (64) Es kritisierte die falsche Werbung, welche von privaten Nabelschnurblut-Banken propagiert wird. Informationen über die Indikation, den wissenschaftlichen Fortschritt und der

Therapieerfolge allogener CBT und BMT werden nicht klar von denen der autologen abgegrenzt. Das verleite zur Annahme, dass selbige auf die autologe CBT übertragen werden kann. Das Gremium äußerte ernsthafte Bedenken hinsichtlich der Legitimität privater Nabelschnurblutbanken für den autologen Gebrauch, da sie eine Dienstleistung verkaufen, die derzeit keinen wirklichen Nutzen in Bezug auf therapeutische Optionen hat und somit mehr versprechen, als sie bieten können. Der WMDA-Vorstand verabschiedete 2006 eine Richtlinie zum Nutzen autologer und familiärer UCB-Lagerung. (107) In der Erklärung wird gefordert, dass alle Nabelschnurblutbanken denselben Standards und Akkreditierungsanforderungen unterliegen und dass eine Förderung oder allgemeine Finanzierung von autologem und verwandtem Nabelschnurblut ohne medizinische Indikation nicht von der Regierung unterstützt werden sollte.

Trotz aller Bemühungen besteht bis heute kein Konsens über die optimalen Kultivierungstechniken (58-60, 80-83) für klinisch orientierte in vitro Zellexpansion. Ohne ein genaues Verständnis über das komplexe Zusammenspiel zwischen HSPCs und der SCN, sowie in weiterer Folge eine optimale Umsetzung der Bedingungen innerhalb des Körpers auf ein Kulturmodell, stellt die in vitro Zellexpansion ein nicht ungefährliches Wagnis dar. (92-94, 97-99) Die örtliche Trennung aus der gewohnten Umgebung in ein System, welches ohne die Aufsicht durch das Immunsystem kontrolliert wird und wo hoher Sauerstoffpartialdruck herrscht, birgt gewisse Gefahren, wie oxidativen Stress, Mutationen (92, 93) und Verringerung der LT-HSCs. (97) Neben den wissenschaftlichen und medizinischen Bedenken (69, 100, 104) dürfen die ethischen (64, 106, 107) nicht außer Acht gelassen werden. Aufgrund der aktuellen Datenlage, des geringen klinischen Einsatzes der CBTs, und anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, kann die Transplantation von in-vitro kultivierten UCB-HSPCs, v.a. zur autologen Nutzung, nicht befürwortet werden. Zu betonen bleibt, dass das Nabelschnurblut eine zu kostbare Stammzellquelle darstellt, als dass es nach der Geburt einfach der Entsorgung zugeführt wird und nicht einer Verwendung bzw. Forschung zu Gute kommt. (62-64) Es gilt umso mehr die Expansion der UCB-HSPCs zu verbessern, Risiken nicht zu ignorieren und in diesem Sinne die Forschung zu fördern. Öffentliche Nabelschnurbanken, welche diesem Zwecke dienlich sind, könnten ein schnelles wissenschaftliches Vorankommen unterstützen.

Limitationen dieser Methodik stellen die durch den hohen personellen und finanziellen Aufwand gegebenen Umstände, wie geringe Anzahl an Nabelschnurblutproben und die Kultivierung unter hohem Sauerstoffdruck, dar.

Konklusion:

In dieser Langzeitstudie (38-wöchige Passagierung der MNCs und CD34+ Zellen; 26-wöchige Passagierung der CFU-GM und BFU-E) geht die Tendenz zur Abnahme und der abrupte Abfall v.a. der roten Zelllinie hervor. Wenn auch im Rahmen anderer Studien, wie z.B. in der von de Lima et al. (82), nach einer ca. 2-wöchigen Kultivierungs-Phase eine Expansion der HSPCs und in weiterer Folge ein schnelleres Engraftment verzeichnet wurde; darf nicht außer Acht gelassen werden, dass anscheinend jene Zellen, welche für eine langfristige Repopulation verantwortlich wären (LT-HSCs), in vitro dezimiert wurden und etwa zwei Drittel der Patienten/-innen verstarben. (82) Dies steht wiederum mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Einklang. Mit zunehmender Passagierung wurde eine Abnahme der Fähigkeit, Kolonien zu bilden, beobachtet. Es scheint, dass die anfängliche Proliferationskapazität im Laufe der Zeit verloren geht, oder dass in vitro jene HSPCs dezimiert werden, die für eine langfristige Repopulation fähig wären. Darauf beruhend ist die zahlenmäßige Vermehrung der UCB-HSPCs allein nicht ausschlaggebend. Diese führt zwar zu einem frühen aber lediglich transienten Engraftment. (82, 90) Die Qualität der UCB-HSPCs bzw. ihre hohe Proliferationskapazität über einen längeren Zeitraum hinweg ist für ein LT-Engraftment entscheidend. Da bei in vitro Kultivierung von Stamm- und Progenitorzellen auch ein gewisses Gefahrenpotenzial beobachtet wurde, sollten zytogenetische Analysen vor Transplantationen durchgeführt werden.

Ausblick:

Es wäre von Interesse, die Untersuchungen mittels einer stromhaltigen Kultivierungsmethode in einer hypoxischen Kammer fortzusetzen und anschließend eine molekulargenetische Überprüfung der UCB-HSPCs durchzuführen, um feststellen zu können, ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Einschränkung der Proliferationskapazität auch auf dieses Kultivierungsmodell übertragbar ist.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. MacLean AL, Lo Celso C, Stumpf MP. Concise Review: Stem Cell Population Biology: Insights from Hematopoiesis. *Stem Cells*. 2017;35(1):80-8.
2. Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. 1909. Available from: <http://www.ctt-journal.com/1-3-maximov-1909-in-german-pdf.html>.
3. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964;51:29-36.
4. Hima Bindu A, Srilatha B. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *J Stem Cell Res Ther* 2011;1(3).
5. Ho AD, Holstein TW. Vom Prinzip des Lebens - im Mikrokosmos der Stammzellen. 2013. Updated: 25.04.2018. Available from: <http://heup.uni-heidelberg.de/journals/index.php/rupertocarola/article/view/11398/5253>.
6. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif*. 2004;37(1):23-34.
7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
8. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):640-53.
9. Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(10):643-55.
10. Korbling M, Estrov Z, Champlin R. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32 Suppl 1:S23-4.
11. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. 2016;351(6269):aab2116.
12. Ema H, Morita Y, Suda T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2014;42(2):74-82 e2.
13. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
14. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 2013;502(7473):637-43.
15. Mendelson A, Frenette PS. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med*. 2014;20(8):833-46.
16. Boulais PE, Frenette PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 2015;125(17):2621-9.
17. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-34.
18. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481(7382):457-62.
19. Ding L, Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature*. 2013;495(7440):231-5.
20. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 2013;495(7440):227-30.
21. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):251-64.
22. Kobayashi H, Butler JM, O'Donnell R, Kobayashi M, Ding BS, Bonner B, et al. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1046-56.

23. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-21.
24. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 2011;147(5):1146-58.
25. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
26. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1994;179(5):1677-82.
27. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-6.
28. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-41.
29. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-36.
30. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-88.
31. Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(16):6503-8.
32. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-21.
33. Browser UG. Human Gene SOX2 2016. Updated: 28.03.2016. Available from: http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg_gene=uc003fxx.4&hgg_prot=ENST00000325404.2&hgg_chrom=chr3&hgg_start=181711923&hgg_end=181714436&hgg_type=knownGene&db=hg38&hgsid=226446593_z3t4GINY4WRI7QSog7aDN1RumCka.
34. Yokota E, Yamatsuji T, Takaoka M, Haisa M, Takigawa N, Miyake N, et al. Targeted silencing of SOX2 by an artificial transcription factor showed antitumor effect in lung and esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(61):103063-76.
35. Fruehauf S, Veldwijk MR, Seeger T, Schubert M, Laufs S, Topaly J, et al. A combination of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and plerixafor mobilizes more primitive peripheral blood progenitor cells than G-CSF alone: results of a European phase II study. *Cytotherapy*. 2009;11(8):992-1001.
36. Grover A, Mancini E, Moore S, Mead AJ, Atkinson D, Rasmussen KD, et al. Erythropoietin guides multipotent hematopoietic progenitor cells toward an erythroid fate. *J Exp Med*. 2014;211(2):181-8.
37. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-61.
38. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327-34.
39. Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, et al. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*. 2009;457(7225):92-6.
40. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):685-97.

41. Papayannopoulou T, Priestley GV, Nakamoto B. Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood*. 1998;91(7):2231-9.
42. Umemoto T, Matsuzaki Y, Shiratsuchi Y, Hashimoto M, Yoshimoto T, Nakamura-Ishizu A, et al. Integrin alphavbeta3 enhances the suppressive effect of interferon-gamma on hematopoietic stem cells. *EMBO J*. 2017;36(16):2390-403.
43. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010;464(7290):852-7.
44. Shitara S, Hara T, Liang B, Wagatsuma K, Zuklys S, Hollander GA, et al. IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCRgammadelta+ intraepithelial lymphocytes. *J Immunol*. 2013;190(12):6173-9.
45. Tabbara IA, Robinson BE. Hematopoietic growth factors. *Anticancer Res*. 1991;11(1):81-90.
46. Koury MJ, Bondurant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem*. 1992;210(3):649-63.
47. Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol*. 2014;5:3.
48. England SJ, McGrath KE, Frame JM, Palis J. Immature erythroblasts with extensive ex vivo self-renewal capacity emerge from the early mammalian fetus. *Blood*. 2011;117(9):2708-17.
49. Ellis SL, Grassinger J, Jones A, Borg J, Camenisch T, Haylock D, et al. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood*. 2011;118(6):1516-24.
50. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002;3(7):687-94.
51. Biowissenschaften DRfEid. Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen 2015. Updated: 06.2019. Available from: <http://www.drze.de/im-blickpunkt/stammzellen>.
52. Mai Q, Yu Y, Li T, Wang L, Chen MJ, Huang SZ, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res*. 2007;17(12):1008-19.
53. Ulrich M. Technik der Jamshidi-Punktion. Available from: http://www.m-ulrich.de/Texte/HAEMATOLOGIE/jamshidi_punktion.pdf.
54. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(7):2804-8.
55. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*. 2007;82(6):463-72.
56. Walenda T. In vitro Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen durch Komponenten der Stammzellnische. Aachen: RWTH Aachen University; 2011.
57. Wagner W, Roderburg C, Wein F, Diehlmann A, Frankhauser M, Schubert R, et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells*. 2007;25(10):2638-47.
58. Zhang CC, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood*. 2008;111:3415-23.
59. Fan X, Gay FP, Lim FW, Ang JM, Chu PP, Bari S, et al. Low-dose insulin-like growth factor binding proteins 1 and 2 and angiopoietin-like protein 3 coordinately stimulate ex vivo expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem cells as assayed in NOD/SCID gamma null mice. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(3):71.

60. Bari S, Zhong Q, Fan X, Poon Z, Lim AST, Lim TH, et al. Ex Vivo Expansion of CD34(+) CD90(+) CD49f(+) Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Non-Enriched Umbilical Cord Blood with Azole Compounds. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(5):376-93.
61. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321(17):1174-8.
62. Sullivan M, Browett P, Patton N. Private umbilical cord blood banking: a biological insurance of dubious future benefit! *The New Zealand Medical Journal.* 2005;118.
63. Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med.* 2000;342(25):1846-54.
64. Technologies TEGiSaN. Ethical Aspects of umbilical cord blood banking. 2004.
65. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351(22):2276-85.
66. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, DeFor TE, Gooley TA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood.* 2010;116:4693-99.
67. Baron F, Ruggeri A, Beohou E, Labopin M, Mohty M, Blaise D, et al. Single- or double-unit UCBT following RIC in adults with AL: a report from Eurocord, the ALWP and the CTIWP of the EBMT. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):128.
68. Butler MG, Menitove JE. Umbilical cord blood banking: an update. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(8):669-76.
69. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Basak GW, Bonini C, Duarte R, et al. Is the use of unrelated donor transplantation leveling off in Europe? The 2016 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. *Bone Marrow Transplant.* 2018.
70. Österreich ÖG. Stammzellspende 2016. Updated: 01.09.2016. Available from: <https://www.gesundheit.gv.at/gesundheitsystem/leistungen/transplantation/stammzellspende>.
71. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med.* 1997;337(6):373-81.
72. Hwang WY, Samuel M, Tan D, Koh LP, Lim W, Linn YC. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007;13(4):444-53.
73. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood.* 2001;97(10):2962-71.
74. Barker JN, Davies SM, DeFor T, Ramsay NK, Weisdorf DJ, Wagner JE. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood.* 2001;97(10):2957-61.
75. Dalle JH, Duval M, Moghrabi A, Wagner E, Vachon MF, Barrette S, et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(6):605-11.
76. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351(22):2265-75.
77. Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Oiwa-Monna M, et al. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors

- with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood*. 2007;109(3):1322-30.
78. Eapen M, Rocha V, Sanz G, Scaradavou A, Zhang MJ, Arcese W, et al. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(7):653-60.
79. Eapen M, Klein JP, Ruggeri A, Spellman S, Lee SJ, Anasetti C, et al. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood*. 2014;123:133-40.
80. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med*. 2010;16(2):232-6.
81. Gammaitoni L, Bruno S, Sanavio F, Gunetti M, Kollet O, Cavalloni G, et al. Ex vivo expansion of human adult stem cells capable of primary and secondary hemopoietic reconstitution. *Exp Hematol*. 2003;31(3):261-70.
82. de Lima M, McNiece I, Robinson SN, Munsell M, Eapen M, Horowitz M, et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med*. 2012;367(24):2305-15.
83. Dumont N, Boyer L, Emond H, Celebi-Saltik B, Pasha R, Bazin R, et al. Medium conditioned with mesenchymal stromal cell-derived osteoblasts improves the expansion and engraftment properties of cord blood progenitors. *Exp Hematol*. 2014;42(9):741-52 e1.
84. Fibbe WE, Zijlmans JM, Willemze R. Differential short-term and long-term repopulating ability of stem cell subsets in mice. *Stem Cells*. 1997;15 Suppl 1:47-51; discussion 2-3.
85. Glimm H, Schmidt M, Fischer M, Schwarzwaelder K, Wissler M, Klingenberg S, et al. Efficient marking of human cells with rapid but transient repopulating activity in autografted recipients. *Blood*. 2005;106(3):893-8.
86. Flores-Guzman P, Fernandez-Sanchez V, Valencia-Plata I, Arriaga-Pizano L, Alarcon-Santos G, Mayani H. Comparative in vitro analysis of different hematopoietic cell populations from human cord blood: in search of the best option for clinically oriented ex vivo cell expansion. *Transfusion*. 2013;53(3):668-78.
87. Guo B, Huang X, Cooper S, Broxmeyer HE. Glucocorticoid hormone-induced chromatin remodeling enhances human hematopoietic stem cell homing and engraftment. *Nat Med*. 2017;23(4):424-8.
88. Hoggatt J, Mohammad KS, Singh P, Pelus LM. Prostaglandin E2 enhances long-term repopulation but does not permanently alter inherent stem cell competitiveness. *Blood*. 2013;122(17):2997-3000.
89. Goessling W, Allen RS, Guan X, Jin P, Uchida N, Dovey M, et al. Prostaglandin E2 enhances human cord blood stem cell xenotransplants and shows long-term safety in preclinical nonhuman primate transplant models. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):445-58.
90. Cutler C, Multani P, Robbins D, Kim HT, Le T, Hoggatt J, et al. Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013;122(17):3074-81.
91. Peled T, Shoham H, Aschengrau D, Yackoubov D, Frei G, Rosenheimer GN, et al. Nicotinamide, a SIRT1 inhibitor, inhibits differentiation and facilitates expansion of hematopoietic progenitor cells with enhanced bone marrow homing and engraftment. *Exp Hematol*. 2012;40(4):342-55 e1.
92. Thomay K, Schienke A, Vajen B, Modlich U, Schambach A, Hofmann W, et al. Chromosomal instability and telomere shortening in long-term culture of hematopoietic stem cells: insights from a cell culture model of RPS14 haploinsufficiency. *Cytogenet Genome Res*. 2014;142(1):14-20.
93. Prockop DJ, Keating A. Relearning the lessons of genomic stability of human cells during expansion in culture: implications for clinical research. *Stem Cells*. 2012;30(6):1051-2.

94. Gadalla SM, Savage SA. Telomere biology in hematopoiesis and stem cell transplantation. *Blood Rev.* 2011;25(6):261-9.
95. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(13):5431-6.
96. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood.* 2007;110(8):3056-63.
97. Mantel CR, O'Leary HA, Chitteti BR, Huang X, Cooper S, Hangoc G, et al. Enhancing Hematopoietic Stem Cell Transplantation Efficacy by Mitigating Oxygen Shock. *Cell.* 2015;161(7):1553-65.
98. Naka K, Muraguchi T, Hoshii T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(11):1883-94.
99. Dircio-Maldonado R, Flores-Guzman P, Corral-Navarro J, Mondragon-Garcia I, Hidalgo-Miranda A, Beltran-Anaya FO, et al. Functional Integrity and Gene Expression Profiles of Human Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Generated In Vitro. *Stem Cells Transl Med.* 2018.
100. M. S. Banking on cord blood stem cells 2008; 8:[554-63 pp.].
101. Majhail NS. Indications for Autologous and Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2015.
102. Ferreira E, Pasternak J, Bacal N, de Campos Guerra JC, Mitie Watanabe F. Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24(9):1041.
103. Hayani A, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D, Salvi SN. First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia. *Pediatrics.* 2007;119(1):e296-300.
104. Urban C, Schwinger W, Benesch M, Sovinz P, Henze G, Greinix H. Autologous cord blood transplantation in a child with acute lymphoblastic leukemia and central nervous system relapse. *Pediatrics.* 2007;119(5):1042-3; author reply 3.
105. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med.* 2009;360(26):2730-41.
106. L. S. Development of stem cells from umbilical cord blood and blood banking: "Non-controversial" and "free of political and ethical debate" *J Law Med.* 2012;19(3):490-6.
107. World Marrow Donor Association. WMDA Policy Statement on the Utility of Autologous or Family Cord Blood Unit Storage 2006.

6 ANHANG

6.1 QUALITÄTSKRITERIEN, REAGENZIEN UND EINMALARTIKEL

6.1.1 QUALITÄTSKRITERIEN

- UCB-Volumen >40 ml
- CD34+ Zellen > 0,15%
- CD34+ Zellen total > 1×10^6 Zellen

6.1.2 REAGENZIEN

- FACS: HSC-Panel

IgG1 FITC	Beckman	A07795
IgG1 ECD	Beckman	A07797
IgG1 PC5.5	Beckman	A62833
IgG1 PC7	Beckman	737662
IgG1 APC	Beckman	IM2475
IgG1 APC-AF750	Beckman	A79393
IgG1 PB	Beckman	A74764
IgG1 KrO	Beckman	A96415
CD34 FITC	Beckman	IM1870U
CD56 ECD	Beckman	A82943
CD19 PC5.5	Beckman	A66328
CD14 PC7	Beckman	A22331
CD133/1 (AC133) APC	Miltenyi	130-090-826
CD3 APC –AF750	Beckman	A94680
CD15 PB	Beckman	A74775
CD45 KrO	Beckman	A96416

- ACDA-Lösung: Trocar-Anschl 8001894, 500 ml
- Annexin V-FITC/7-AAD Kit, Beckman, IM3614, 150 tests
- BSA 10% Solution, Sigma A1595, 50 ml

- CD34 Direct Isolation Kit, 2,2 ml, Miltenyi, 46702
- DMSO: WAK-Chemie, DMSO-10 cryo-sure 10x10ml
- Ethanol 70 %, Apotheke
- FBS: Gibco 10270
- Ficoll: GE Healthcare 17-1440-03
- Flt3/Flk2 (50µg/ml), FLT-3/FLK2 Ligand human, R&D-308FK, 25 µg
 - 50µg/ml: 2 x 25 µg in 1000 PBS/1%BSA lösen
 - aliquotieren: 6 x 160 µl
 - Haltbarkeit: 3 Monate (gelöst bei -20°C)
- Hydrocortison: Sigma H2270-100 mg
 - 1mM: 1 mg einwiegen
in 2 ml A.dest lösen
 - Haltbarkeit: 1 Woche (gelöst bei 2-8°C)
- IL-6 (10µg/ml), IL-6 human, Sigma I1395, 10µg
 - 10µg/ml: 10 µg in 100µl A.dest lösen
+ 900 µl PBS/1%BSA
 - aliquotieren: 6 x 160 µl
 - Haltbarkeit: > 3 Monate (gelöst bei -20°C)
- IMDM w/o Phenolrot, Gibco 21056023
- Kulturmedium

50ng/ml	SCF	150 µl
50ng/ml	Flt3/Flk2	150 µl
10ng/ml	TPO	150 µl
10ng/ml	IL-6	150 µl
10%	FBS	15 ml
	IMDM	134,4 ml
- Lysepuffer: 500 ml, Apotheke
- MACS-Puffer:

PBS	47,1 ml
0,5 % BSA	2,5 ml 10% BSA
2 mM EDTA	0,4 ml 0,25 M EDTA
- Methocult GF H4434, 100 ml Stemcell 04434
- Methocult GF H4434, 24 x 3 ml Stemcell 04444
- Myelocult H5100, 100 ml Stemcell 05100
- 0,25M NaEDTA: Apotheke, 50 ml

- PBS: Gibco Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 14190-169, 10x500ml
- PBS pH7,2-7,3+Na-Azid 0,1%, 500 ml, Apotheke
- Propidium Iodide Solution, Miltenyi 130-093-233, 100 µg/ml, 2 ml
- RNase, Roche 11119915001, 500 µg, 1 ml
- RPMI 16040, Gibco, 42401018, 500 ml
- SCF 50 µg/ml
- TPO 10 µg/ml (von Station oder Ambulanz?)
- Trypsin EDTA 0,25 %, Sigma T4049, 100 ml

6.1.3 EINMALARTIKEL

- 75 cm² Kulturflaschen, Costar 430641, 100 Stk./Pck.
- 225 cm² Kulturflaschen, Costar 3001, 24 Stk./Pck.
- 50 ml Falcons, BD 2098, 500 Stk./Pck.
- 15 ml Falcons, Corning 430052, 500 Stk./Pck.
- Stripette 5 ml, Costar 4051, 200 Stk./Pck.
- Stripette 10 ml, Costar 4101, 200 Stk./Pck.
- Stripette 25 ml, Costar 4251, 200 Stk./Pck.
- Stripette 50 ml, Costar 4501, 100 Stk./Pck.
- Filtertips 0,1-10 µl, Eppendorf 0030 077512, 960 Stk./Pck.
- Filtertips 2-100 µl, Eppendorf 0030 077547, 960 Stk./Pck.
- Filtertips
- Filtertips 50-1000 µl, Eppendorf 0030 077571, 960 Stk./Pck.
- Combitips plus Biopur 10 ml, Eppendorf 0030 069463, 100 Stk./Pck.
- Reaktionsgefäße Biopur 0,5 ml, Eppendorf 0030 121570, 50 Stk./Pck.
- Reaktionsgefäße Biopur 1,5 ml, Eppendorf 0030 121589, 100 Stk./Pck.
- Reaktionsgefäße Biopur 2 ml, Eppendorf 0030 121597, 100 Stk./Pck.
- Matrix-Röhrchen 1,4 ml, Matrix 4140, 1000 Stk./Pck.
- MACS-Säule MS, Miltenyi 130042201, 25 Stk./Pck.
- MACS-Säule LS, Miltenyi 130042401, 25 Stk./Pck.
- Kulturschale 100 mm, Nunc 172958, 480 Stk./Pck.

- Kulturschale 35 mm, BD 1008, 500 Stk./Pck.
- Pasteurpipette, 3,2 ml, Roth EA66.1, 500 Stk./Pck.
- 48 well Kultur, Corning Costar CLS3548-100EA, 100 Stk./Pck.
- Teströhrchen 12x75 mm, Beckman 2523749, 250 Stk./Pck.

6.2 TABELLEN

Tabelle 55: Reinheit der Proben [%]

	HSC 15	HSC 16	HSC 17	HSC 19	HSC 21
P3	46,78	87,15	83,68	36,41	80,58
P4	64,26	65,39	88,23	39,09	87,20
P5	43,45	67,66	93,06	32,15	83,86
P6	69,13	87,03	91,19	35,90	87,73
P7	73,78	67,19	86,46	42,67	90,60
P8	89,08	79,84	91,79	38,64	92,43
P9	91,77	87,96	82,49	42,59	94,58
P10	41,81	88,16	87,93	54,76	94,95
P11	90,50	88,65	79,89	34,26	93,54
P12	85,62	85,51	90,33	25,09	89,67
P13	90,20	88,82	79,95	69,26	86,07
P14	89,90	82,63	88,11	72,89	73,20
P15	80,64	90,14	90,41	34,67	89,03
P16	87,98	94,82	83,49	37,73	91,22
P17	86,37	95,69	63,87	33,49	93,31
P18	82,40	87,86	82,03	49,74	94,31
P19	88,60	88,99	80,88	46,71	82,49
P20	82,66	82,72	69,21	26,24	87,99
P21	76,88	88,02	86,75	34,11	91,16
P22	84,05	50,11	80,98	66,09	78,82
P23	83,13	66,46	68,65	27,57	79,28
P24	73,46	72,33	79,74	35,15	87,29
P25	82,77		70,35	39,53	85,01
P26	76,70		69,25	35,57	86,46
P27	83,35		78,53	47,74	89,04
P28	75,35		61,66	45,84	77,24
P29	77,22		83,50	43,55	77,28
P30	72,72		81,34	42,37	
P33			77,77	43,87	
P36				66,23	
P38			74,79		

HSC 15-21: hämatopoietische Stammzellen der Proben 15-21; P 03-38: Passagen