

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie
Der Medizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums
rechts der Isar

Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel

Einfluss verschiedener MR-Markierungstechniken
auf das Wachstum und Überleben hämatopoietischer
CD34+-Stammzellen aus Nabelschnurblut

Präklinische Studie in Verbindung mit Stammzelltherapien

Viktoria Bekker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. R.A. J. Oostendorp
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster (schriftliche Beurteilung)
2. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 09.05.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.10.2012 angenommen.

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1. Grundlagen zu Stammzellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut.....	1
1.2. Bisherige Anwendungen in der Transplantationsmedizin.....	4
1.3. Therapeutisches Potenzial in der regenerativen Medizin.....	8
1.4. Mögliche Optimierung von Stammzellen mit Nabelschnurblut..	11
1.4.1. Charakterisierung und Anreicherung hämatopoietischer Stammzellen.....	11
1.4.2. <i>Ex Vivo</i> Vermehrung hämatopoietischer Stammzellen.....	12
1.4.3. <i>In Vivo</i> Visualisierung der Wanderung transplanteder Stammzellen.....	14
1.4.3.1 Vor- und Nachteile bildgebender Techniken in Bezug auf die Hämatopoese.....	15
1.4.3.2 Kontrastmittel und Markierungstechniken für MRT.....	19
1.5. Ziele der Arbeit.....	22
2. Methoden.....	24
2.1. Gewinnung mononukleärer Stammzellen.....	24
2.2. Isolation von CD34+-Zellen.....	25
2.2.1. Grundprinzip der Methode.....	25
2.2.2. Protokoll der Markierung.....	27
2.2.3. Protokoll der Säulenseparation.....	27
2.3. Markierung mit Kontrastmittel für MR-Bildgebung.....	27

	Seite
2.4. Kolonie-bildende Vorläuferzellen und deren Regulation durch CSF.....	29
2.5. <i>In-Vitro</i> -Messung des Wachstums- und Differenzierungspotenzials hämatopoietischer Vorläuferzellen auf Methylzellulose.....	31
2.6. <i>In-Vitro</i> -Messung des Wachstumspotenzials hämatopoietischer Vorläuferzellen in Langzeitkulturen.....	33
2.7. Kontrolle von Reinheit und Apoptoseanteil mittels Durchflusszytometrie.....	34
2.8. Zellyse und Proteinbestimmung.....	38
2.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.10. Westernblot.....	43
2.11. Statistische Analysen.....	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1. <i>In-Vitro</i> -Effekte der Behandlung/Markierung humaner CD34+-Zellen mit MR-Kontrastmittel.....	46
3.1.1. Überleben und Apoptosegrad nach Markierung.....	46
3.1.2. Wachstums- und Differenzierungspotenzial von 14-Tage-Kulturen.....	49
3.1.3. Wachstumspotenzial von Langzeitkulturen.....	56
3.1.4. Expression regulatorischer Proteine nach Markierung.....	58
4. Diskussion.....	60
4.1. Allgemeine Aspekte zu klinisch anwendbaren MR-Markierungstechniken.....	62
4.2. Vergleich der <i>In-Vitro</i> -Resultate mit anderen Markierungstechniken.....	64

	Seite
4.3. Diskussion der <i>In-Vivo</i> -Resultate.....	67
4.4. Einfluss der Markierungstechnik auf das Überleben hämatopoetischer Stammzellen.....	70
5. Zusammenfassung.....	73
5.1. Summary.....	75
6. Literatur.....	77
7. Anhang.....	99
7.1. Abkürzungen.....	
7.2. Kopie einer publizierten Folgestudie.....	
7.3. Danksagung.....	
7.4. Ehrenwörtliche Erklärung.....	
7.5. Lebenslauf.....	

1. EINLEITUNG

1.1. Grundlagen zu Stammzellen aus Knochenmark und Nabelschnurblut

Stammzellen bilden die Basis der Organentwicklung. Sie sind charakterisiert durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in reife Zellen mit bestimmten morphologischen und funktionellen Eigenschaften. Man unterscheidet embryonale und adulte Stammzellen. Embryonale Stammzellen werden als pluripotent bezeichnet, da sie zu Zelltypen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm und Ektoderm) ausreifen können, d.h. zu allen Zell- und Gewebetypen eines kompletten Organismus. Adulte oder auch somatische Stammzellen zeigen dagegen ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial. Als multipotente Stammzellen kommen sie sowohl in Knochenmark, peripherem Blut und Nabelschnurblut vor als auch in verschiedenen Geweben, wie Muskel, Myokard, Leber und Gehirn, die zur gewebespezifischen Regeneration befähigt sind (Prockop et al., 2003). Adulte Stammzellen des Knochenmarks differenzieren unter anderem in hämatopoetische Stammzellen (HSZ) sowie in endotheliale und mesenchymale Stammzellen (Kondo et al., 2003). *In-Vitro*- und *In-Vivo*- Experimente weisen auf eine mögliche Nutzung dieser Multipotenz für die Geweberegeneration hin. Welche Bedeutung insbesondere Stammzellen aus Nabelschnurblut in der regenerativen Medizin haben, wird in Kapitel 1.3 dargestellt.

Die hämatopoetische Stammzelle im Knochenmark, die im Mausmodell intensiv untersucht wurde, gilt als Prototyp der adulten Stammzelle. Die beim Erwachsenen im Knochenmark vorkommende multipotente hämatopoetische Stammzelle steht am Anfang der Entwicklung aller Blutzelltypen und ist lebenslang für die Regeneration des gesamten Blutsystems verantwortlich (Re und Wolf, 2007) (Abb.1: Hämatopoese).

Jede sich teilende hämatopoetische Stammzelle hat verschiedene Entwicklungswege: Selbsterneuerung, Differenzierung zu linienspezifischen Vorläuferzellen und Eliminierung durch programmierten Zelltod oder Apoptose.

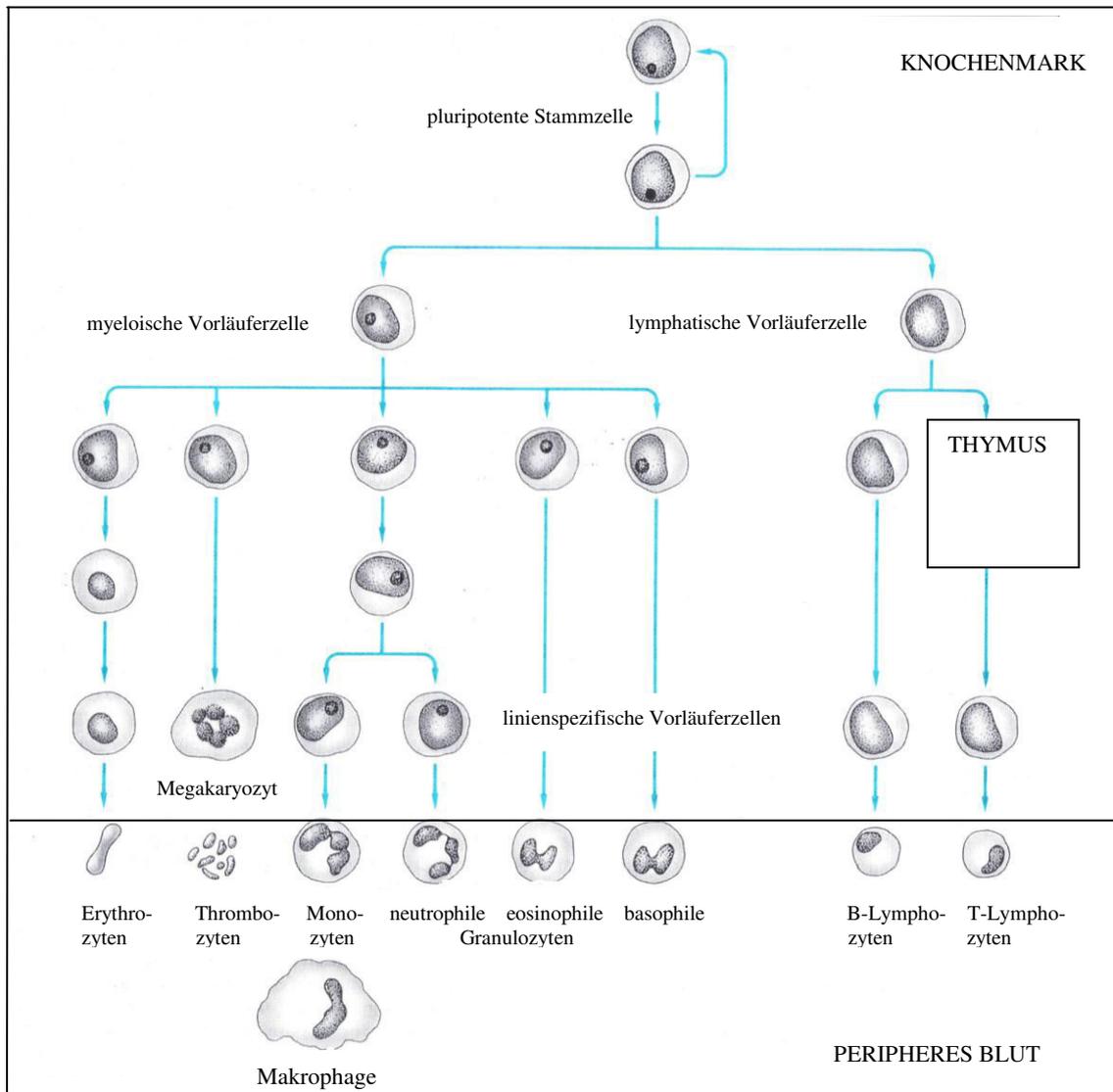


Abb.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese (mod. nach Fauser, 1997). Alle Blutzelltypen entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen, die sich selbst ständig erneuern. Unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren und weiteren Regulationen entstehen zunächst lymphatische und myeloische Vorläuferzellen, die auf einem definierten Entwicklungsweg über linienspezifische Vorläuferzellen zu funktionsfähigen Zellen des peripheren Blutes proliferieren und differenzieren. Diese Vorgänge finden fast ausschließlich im Knochenmark statt. Vorläuferzellen der T-Lymphozyten wandern jedoch nach ersten Reifungsstadien zur weiteren Ausreifung in den Thymus.

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) werden wie Stammzellen anderer Organe durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

- ein hohes proliferatives Potenzial,
- den Erhalt von Stammzeleigenschaften von mindestens einer Tochterzelle bei der Teilung (Selbsterneuerung),
- die Fähigkeit differenzierte Zellen aller Blutzellreihen zu bilden (Multipotenz) und
- eine hohe Langlebigkeit (Buske et al., 2006).

Auf der Basis von Transplantationsexperimenten im Mausmodell stellt das hämatopoetische System ein heterogenes Gemisch von unreifen Stammzellen und mehr oder weniger differenzierten Vorläuferzellen dar (Re und Wolf, 2007). Man unterscheidet mindestens drei Reifegrade von multipotenten Stammzellen mit unterschiedlicher Proliferations- und Differenzierungskapazität, wie langzeitrepopulierende Stammzellen (long-term repopulating stem cells), die zu einer langfristigen Rekonstitution der Hämatopoese führen können und kurzzeitrepopulierende Stammzellen (short-term repopulating stem cells), die lediglich kurzfristig (z.B. während der ersten 3 Monate nach Transplantation) die Hämatopoese aufrechterhalten können und multipotente Vorläuferzellen ohne erkennbares Selbsterneuerungspotenzial (Morrison et al., 1997 und 1994). Zur Charakterisierung und Unterscheidung von frühen primitiven und reiferen HSZ-Subpopulationen werden viele phänotypische Marker, d.h. spezifische Oberflächenstrukturen verwendet, u.a. CD34, CD48, CD90, CD135 und CD150 (Renström et al., 2009).

Die Forschung an adulten Stammzellen insbesondere aus Nabelschnurblut gewinnt als Alternative zur embryonalen Stammzellforschung zunehmende klinische Bedeutung.

Nabelschnurblut von Neugeborenen enthält infolge des frühen Stadiums im Vergleich zu Stammzellquellen von Erwachsenen (Knochenmark und peripherem Blut) einen höheren Anteil primitiver HSZ und Vorläuferzellen mit einem höheren Wachstumspotenzial (Mayani et al., 1998; Gluckman et al., 1997). Fortschritte im Verständnis der Regulation von HSZ und vor allem der Mechanismen der Selbsterneuerung haben die therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten erweitert. HSZ aus Knochenmark und Nabelschnurblut werden bereits seit vielen Jahren therapeutisch im Rahmen von Transplantationsverfahren unter anderem bei Patienten mit Leukämien genutzt.

1.2. Bisherige Anwendungen in der Transplantationsmedizin

Die erste erfolgreiche Transplantation von Nabelschnurblut (NSB) wurde 1988 an einem fünfjährigen Jungen mit Fanconi-Anämie durchgeführt (Gluckman et al., 1989). Er erhielt HLA-identisches Nabelschnurblut seiner neugeborenen Schwester. Seitdem werden HSZ aus NSB weltweit als Alternative zu adulten Stammzellen aus Knochenmark für die allogene Stammzelltransplantation und Therapie von Erkrankungen des blutbildenden Systems (Leukämien, Hämoglobinopathien, Knochenmarkinsuffizienzen, angeborene Immundefekte) eingesetzt (Gluckman u. Rocha, 2004). Nach Hochdosis-Chemotherapie von Leukämien ermöglichen diese Stammzellen die schnelle Regeneration der Hämatopoese (Barker u. Wagner, 2003). NSB wurde weltweit bisher bei über 9.700 allogenen Stammzelltransplantationen verwendet (www.netcord.org/inventory.html). Der Anteil von NSB an allen Stammzelltransplantationen liegt in Europa nur bei ca. 3,1 % und in Deutschland bei 1 %, hat jedoch in den USA bei Kindern deutlich zugenommen und beträgt 13,5 % (Kongress Report aktuell in Gynäkologie + Geburtshilfe, 2008). Die Bedeutung der Transplantation von Nabelschnurblutzellen spiegelt sich auch im zunehmenden Aufbau von Nabelschnurblutbanken wider, wo Stammzellen aus Nabelschnurblut prophylaktisch ohne messbaren Funktionsverlust bei -196 °C kryokonserviert und über 10 Jahre gelagert werden.

Ein entscheidender Vorteil der Stammzellen aus NSB ist ihre immunologische Unreife im Vergleich zu adulten Stammzellquellen (Knochenmark und peripherem Blut von Erwachsenen). Bei allogenen Transplantationen mit NSB sind deshalb Abstossungsreaktionen des Transplantats gegenüber dem Empfänger (Graft-versus-Host-Disease, GvHD) deutlich seltener und schwächer (Lee et al., 2010; Kurtzberg, 2009; Bradley und Cairo, 2005; Benito et al., 2004; Rocha et al., 2004; Laughlin et al., 2001). Dadurch kann eine allogene Transplantation mit NSB auch erfolgreich sein, wenn bis zu drei Histokompatibilitätsantigene (HLA) zwischen Spender und Empfänger nicht übereinstimmen (Djakovic und Dietl, 2005). Das erweitert den Kreis der transplantationsfähigen Patienten erheblich und kann das Überleben bei prognostisch sehr ungünstigen Risikopatienten erhöhen (Wagner et al., 2009). Trotzdem finden bis heute annähernd 50 – 70 % der Patienten, die eine Stammzelltransplantation benötigen, keinen geeigneten adulten Spender (Kurtzberg, 2009). Weitere Vorteile von Stammzellen aus NSB gegenüber jenen aus Knochenmark sind:

- Einfache und risikolose Gewinnung und Kryokonservierung,
- Schnelle Verfügbarkeit von kryokonserviertem NSB,
- Geringe Kontamination mit Krankheitserregern und Tumorzellen,
- Sehr junge, vitale und pluripotente Stammzellen,
- Höhere Proliferationskapazität von CD34+-Stammzellen, die für die Blutbildung entscheidend sind (Zhong et al., 2010; Gluckman et al., 1997).

Ein Nachteil von NSB im Vergleich zu Knochenmark ist die geringere Menge (im Durchschnitt werden nach der Abnabelung des Neugeborenen 48 ml stammzellhaltiges Blut aus Nabelschnur und Plazenta gewonnen (Jacobs et al., 2005)) und geringere Zellzahl, die mit einem verzögerten Anwachsen des Transplantats und verzögerter Normalisierung der Neutrophilenzahl verbunden ist (Rocha et al., 2004).

Die mittlere Zeit bis zur Rekonstitution der Neutrophilen dauert bei NSB-Transplantaten länger als bei einer Knochenmarktransplantation (ANC₅₀₀ oder Zeitdauer bis 500 Neutrophile / μ l wiederhergestellt sind: 29 vs. 22 Tage; $p < 0,01$; Barker et al., 2002). Dies führt zu einer erhöhten Inzidenz früher Mortalität nach NSB-Transplantationen (Tag 100: 39 vs. 19 %; Gluckman et al., 2001).

Dadurch waren die bisherigen Anwendungen von NSB vorwiegend auf pädiatrische Tumorpatienten beschränkt, die weniger Stammzellen benötigen als Erwachsene.

Frühere Studien haben gezeigt, dass der Erfolg einer allogenen NSB-Transplantation bei Kindern und Erwachsenen von der Zahl der Stammzellen pro Körpergewicht des Empfängers sowie vom Grad der HLA-Übereinstimmung von Spender und Empfänger abhängt (Gluckman et al., 2004). In vielen Untersuchungen war die Zelldosis (gemessen als Gesamtzahl mononukleärer Zellen (Gluckman et al., 1997 und 2004; Michel et al., 2003; Benito et al., 2004), Zahl der Kolonie-bildenden Zellen (Iori et al., 2004) und Zahl der CD34+-Zellen (Wagner et al., 2002; Gluckman et al., 2004)) kritisch für die Zeitdauer bis zur vollen Rekonstitution des Empfänger Knochenmarks und damit für das krankheitsfreie Überleben (Wagner et al., 2002; Gluckman et al., 2004). Für ein erfolgreiches Anwachsen des Transplantats sind nach dem Auftauen von NSB mindestens $1 - 2 \times 10^7$ kernhaltige Zellen / kg Körpergewicht bei Erwachsenen notwendig und 3×10^7 kernhaltige Zellen / kg bei Kindern (Laughlin et al., 2001, Locatelli et al., 1999).

In einer retrospektiven Studie zu allogenen Stammzelltransplantationen bei ca. 800 Kindern mit Leukämie ergab NSB mit völliger HLA-Übereinstimmung ein deutlich besseres krankheitsfreies Überleben als HLA-identisches Knochenmark (60 % vs. 38 %; Eapen et al., 2007). NSB-Transplantationen, wo Unterschiede in ein oder zwei HLA-Merkmalen vorlagen, führten sogar zu ähnlichen Ergebnissen wie HLA-identische Knochenmarktransplantationen (Eapen und Wagner, 2010).

In einer Metaanalyse erwies sich NSB für allogene Stammzelltransplantationen bei Kindern mit Leukämie als ebenso sicher und effektiv wie Knochenmark mit vergleichbaren langfristigen Überlebensraten (Shi-Xia et al., 2009).

Die Ergebnisse zum Einsatz von Nabelschnurblut beim Erwachsenen waren wegen der limitierten Zellzahl / kg Körpergewicht zunächst weniger ermutigend. Nach allogenen Stammzelltransplantationen von NSB bei Erwachsenen mit hämato-onkologischen Erkrankungen verlief die Normalisierung der Neutrophilenzahl im Vergleich zu Daten von Knochenmarkstransplantierten verzögert (Laughlin et al., 2001; Long et al., 2003). Die Folge war ein erhöhtes Risiko für Infektionen und eine gesteigerte frühe transplantationsabhängige Mortalität. Das kann zum Teil durch den relativ hohen Anteil an Hochrisikopatienten in diesen Studien erklärt werden. Günstigere Resultate publizierten Ooi et al. (2002). Bei 16 an akuter Leukämie erkrankten Patienten, von denen die eine Hälfte eine Stammzelltransplantation aus NSB, die andere Hälfte eine Knochenmarkstransplantation erhielt, war das krankheitsfreie Überleben nach zwei Jahren in beiden Gruppen vergleichbar (85 % für NSB, 75 % für Knochenmark). In einer neuen Studie führten allogene Stammzelltransplantationen bei ca. 170 Erwachsenen mit malignen hämatologischen Erkrankungen zu ähnlichen Ergebnissen mit NSB von nicht verwandten Spendern wie mit Knochenmark oder peripherem Blut von verwandten Spendern (krankheitsfreies Überleben: 70 % vs. 60 %; Rezidivrate: 17 vs. 26 %) (Takahashi et al., 2007). Insgesamt zeigt sich, dass eine unverwandte NSB-Stammzelltransplantation insbesondere bei jungen Erwachsenen in der Frühphase der Erkrankung eine grosse Erfolgswahrscheinlichkeit hat, wenn die kritische Zelldosis nicht unterschritten wird.

Ein wichtiger Schritt zur breiteren klinischen Anwendung von NSB-Stammzelltransplantationen beim Erwachsenen könnte eine neue Methode zur Erhöhung der Zelldosis sein, bei der allogene Doppeltransplantate von zwei unterschiedlichen Spendern eingesetzt werden.

Der Grundgedanke ist, dass bei geringen HLA-Unterschieden jede Spenderzellpopulation die andere nicht abstossen wird und die erhöhte Zelldosis das Anwachsen des Transplantats und das Überleben der Patienten verbessern kann. Erhielten 23 Hochrisikopatienten (24 Jahre) zwei Transplantate, die sich untereinander und im Vergleich zum Empfänger in bis zu zwei HLA-Merkmalen unterschieden, erwies sich die Doppeltransplantation als ebenso sicher wie eine Einzeltransplantation und die Inzidenz einer GvHD war scheinbar nicht erhöht (Barker et al., 2005; Wagner et al., 2002). Nach einer aktuellen Studie mit größeren Fallzahlen (100 – 200) wurde der Einsatz allogener Doppeltransplantate aus NSB insbesondere für Erwachsene ohne verfügbaren Spender von HLA-geeignetem Knochenmark empfohlen (Brunstein et al., 2010).

Andere Anwendungsgebiete für NSB, wie autologe Stammzelltransplantationen insbesondere bei Lymphomen, aber auch bei soliden Tumoren (Retinoblastom und Neuroblastom) und Autoimmunerkrankungen werden hier nicht näher beschrieben.

1.3. Therapeutisches Potenzial in der regenerativen Medizin

In frischem (nicht eingefrorenem) Nabelschnurblut befinden sich auch verschiedene nicht hämatopoetische Stammzellpopulationen, u. a. Endothelzellen (Ott et al., 2005; Yoder et al., 2007), mesenchymale Stromazellen (MSC) (Erices et al., 2000) und sogenannte unrestringierte Stammzellen (USSC) (Kögler et al., 2004). Diese primitiven Stammzellen mit hoher Entwicklungskapazität eröffnen neue Therapiemöglichkeiten für die Geweberegeneration.

Ein potenzielles klinisches Anwendungsgebiet von mesenchymalen Stammzellen (MSC) ist die Behandlung von kritischen Knochendefekten und Erkrankungen mit verminderter osteoblastärer Regenerationsfähigkeit.

Alle Populationen von MSC und USSC aus NSB differenzieren unter geeigneten Kulturbedingungen zu Osteoblasten und Chondroblasten (Bieback et al., 2004; Lee et al., 2004; Kögler et al., 2005 und 2006). Es gibt Hinweise für eine *in vivo* Geweberegeneration nach Xenotransplantation von USSC in einen kritischen Knochendefekt von athymen Nacktratten (Jäger et al., 2004 und 2007). Es konnte gezeigt werden, dass USSC nach der Transplantation über mehrere Wochen überleben und lokal zu Osteoblasten differenzieren.

Vorläufige Befunde zur Stammzelltherapie mit NSB sprechen für Heilungserfolge bei koronarer Herzkrankheit und Herzinfarkt. Die Differenzierung von Stammzellen aus NSB zu Herzmuskelzellen wurde unter *in vitro* Bedingungen aber nur in einer Studie beobachtet (Nishiyama et al., 2007). *In vivo* konnte die Differenzierung von USSC zu Kardiomyozyten zum erstenmal in einem präimmunem Schafföten gezeigt werden (Kögler et al., 2004). Transplantierte USSC konnten auch im Schweinemodell nach künstlich herbeigeführtem Herzinfarkt 4 Wochen überleben und die myokardiale Funktion verbessern (Kim et al., 2005). Im gleichen Modell wurde zwei Monate nach Transplantation eine deutliche Verbesserung der Auswurfraction des linken Ventrikels und eine Hemmung der linksventrikulären Dilatation beobachtet; jedoch liess sich das Überleben der USSC und ihre Differenzierung zu Kardiomyozyten nicht bestätigen (Ghodsizad et al., 2009). Hierbei werden Wirkmechanismen über eine Zytokinausschüttung aus USSC diskutiert (Kögler et al., 2005). Zudem können *in vitro* expandierte CD34+ endotheliale Vorläuferzellen aus NSB nach Transplantation im Rattenmodell eines Myokardinfarkts proliferieren, neue Blutgefässe bilden und die linksventrikuläre Funktion verbessern (Ott et al., 2005).

Heute setzt man auch große Hoffnungen darauf, geschädigtes Nervengewebe nach Schlaganfällen oder Rückenmarksverletzungen sowie neurodegenerativen Erkrankungen durch Stammzellen aus NSB regenerieren zu können.

Es wird durch verschiedene Studien belegt, dass USSC aus NSB unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, zu Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen zu differenzieren (Trapp et al., 2008; Greschat et al., 2008; Fallahi-Sichani et al., 2007; Kögler et al., 2004). Die Behandlung neurologischer Erkrankungen mit Stammzellen aus NSB wurde meist in Tiermodellen zerebraler Ischämien untersucht. Dabei zeigte sowohl die Infusion als auch die intrazerebrale Transplantation therapeutisch günstige Effekte (Chen et al., 2001; Xiao et al., 2005; Bliss et al., 2007). Es gibt drei mögliche Erklärungen. Stammzellen können zu reifen Nervenzellen differenzieren und das geschädigte Gewebe ersetzen. Es gibt aber auch zunehmende Hinweise, dass transplantierte Zellen neurotrophe oder neuroprotektive Faktoren ausschütten, die eine Regeneration von Nervengewebe stimulieren (Newman et al., 2006). Zudem ist es möglich, dass Stammzellen aus NSB inflammatorische Wirkungen modulieren und so Schlaganfall bedingte Läsionen reduzieren können (Vendrame et al., 2005).

Kürzlich wurde in einem Nagermodell für Schlaganfälle gezeigt, dass USSC aus NSB von HGF (hepatocyte growth factor) stark angezogen werden, der aus Ischämie-geschädigtem Nervengewebe und apoptotischen Neuronen *in vitro* und *in vivo* sezerniert wird (Trapp et al., 2008). Eine Wanderung von USSC in Bereiche mit Hirnläsionen kann auch bei anderen neurologischen Erkrankungen vermutet werden. Die Infusion von Stammzellen aus NSB führte in Tiermodellen der amyotrophen Lateral-sklerose (ALS), von Parkinson, Alzheimer und Rückenmarksverletzungen zu Verbesserungen der Krankheitsverläufe (Saporta et al., 2003; Ende et al., 2002; Garbuzova-Davis et al., 2003).

Insgesamt gesehen weisen oben beschriebene Zellkultur- und Tierexperimente auf ein vielversprechendes therapeutisches Potenzial von NSB in der regenerativen Medizin hin. Bevor Stammzellen aus NSB für Zellersatztherapien und für die Geweberegeneration klinisch angewendet werden können, müssen jedoch der Applikationsweg, die optimale Zellmenge und der Wirkungsmechanismus geklärt werden.

USSC und MSC aus frischem Nabelschnurblut lassen sich in der Zellkultur unter GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Practice) bereits erfolgreich vermehren. Ausserdem kann die Notwendigkeit einer Immunsuppression ein zusätzliches Risiko für den klinischen Einsatz von NSB bedeuten.

1.4. Mögliche Optimierung von Stammzelltherapien mit Nabelschnurblut

Der Erfolg einer Stammzelltransplantation kann durch Anreicherung bzw. Aufreinigung von langzeitrepopulierenden Stammzellen (CD34+-Zellen) und Verminderung von reaktiven Immunzellen oder Tumorzellen im Transplantat gesteigert werden (Kondo et al., 2003).

Die Transplantation hoch gereinigter CD34+-Zellen aus peripherem Blut war bei Patienten mit CML im Hinblick auf das 3-Jahres-Überleben einer Transplantation von nicht manipuliertem peripherem Blut oder Knochenmark signifikant überlegen (3-Jahres-Überleben: CD34+-Zellen aus peripherem Blut vs unmanipuliertes peripheres Blut vs Knochenmark: 90 % vs 68 % vs 63 %; Elmaagacli et al., 2003). Bei einer unverwandten Transplantation von NSB konnte eine höhere CD34+-Zelldosis den negativen Einfluss einer HLA-Disparität auf das Überleben partiell reduzieren (Wagner et al., 2002). Darüber hinaus konnten nur CD34+- und CD34+Thy1+-Zellen eine langfristige Rekonstitution des Empfängermarkes stimulieren (Civin et al., 1996; Link et al., 1996; Michallet et al., 2000).

1.4.1. Charakterisierung und Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen

Durch eine Reihe phänotypischer Marker, d.h. spezifische Oberflächenstrukturen, wie CD34, Thy1 und CD133, werden verschiedene Subpopulationen von HSZ charakterisiert (Bonde et al., 2004).

CD34+, ein schweres glykosyliertes Transmembranprotein und Adhäsionsmolekül, wird als klassischer Marker für die Identifizierung von primitiven HSZ betrachtet (Bonnet, 2002; Dao et al., 2003). In Stammzellen aus Nabelschnurblut ist die langfristige hämatopoietische Aktivität ausschließlich an die Expression von CD34 gebunden (Götze et al., 2007). Dieser Marker lässt sich schnell und relativ leicht mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) bestimmen und für die Anreicherung von HSZ ausnutzen (z.B. Apherese von HSZ aus peripherem Blut im Rahmen einer geplanten Stammzelltransplantation). Die Isolation einer reinen hämatopoetischen Stammzellpopulation ist jedoch bisher nicht möglich. Da sich phänotypische Eigenschaften mit der Zellzyklus-Progression verändern können (Dao et al., 2003), versuchte man die Aufreinigung von primitiven HSZ durch den kombinierten Einsatz von klassischen phänotypischen und metabolischen Markern zu optimieren. Die Fraktionierung von NSB auf der Basis fluoreszierender zytosolischer ALDH (Aldehyd-Dehydrogenase) lieferte frühe unreife hämatopoietische Progenitorzellen, die in immun-defizienten NOD/SCID-Mäusen ein erhöhtes Potenzial zur hämatopoietischen Rekonstitution zeigten (Hess et al., 2004).

1.4.2. Ex vivo Vermehrung hämatopoetischer Stammzellen

Limitierungen und spezifische Probleme bei Stammzelltransplantationen aus NSB insbesondere beim Erwachsenen resultieren aus einer unzureichenden Zellzahl. Eine Optimierung der Zellzahl von NSB könnte die Resultate von Stammzelltransplantationen im Hinblick auf die hämatopoetische Rekonstitution, GvHD und das Gesamtüberleben verbessern (Broxmeyer et al., 1992). Deshalb sind Verfahren zur effektiven Amplifikation langzeitrepopulierender Stammzellen *in vitro* von hohem klinischem Interesse.

Mehrere Arbeitsgruppen haben die *ex vivo* Expansion von Nabelschnurblut (NSB) untersucht. Die Zahl von festgelegten Vorläuferzellen und unreifen hämatopoetischen Stammzellen, wie CD34+-Zellen, werden durch Zytokinkombinationen unter Kulturbedingungen erhöht. Eine kurzfristige *in vitro* Kultivierung von CD34+-Zellen aus NSB mit Zytokinen führte zu einer zwei- bis dreifachen Expansion der Stammzellen (Di Giusto et al., 1996). Zhang und Mitarbeiter (2004) verglichen verschiedene Zytokinkombinationen und Konzentrationen, um Vorläuferzellen aus NSB optimal zu expandieren. Mit Hilfe einer Kombination aus SCF, Flt3-Ligand, Thrombopoietin, den Chemokinen (IL-18, MIP1 α) und O-sulfatiertem Heparin in Abwesenheit von Serum zeigten Lewis und Mitarbeiter (2000 und 2001) eine 25-fache Expansion von CFU-GM, 1,3-fache Expansion von LTC-IC (long term culture initiating cells) und die Aufrechterhaltung von NOD-SCID (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency) repopulierenden Zellen (SRC). McNiece und Mitarbeiter (2000) beschrieben eine *ex vivo* Expansion von NSB-Stammzellen, die zu einer erhöhten Zahl von TNC, GM-CFC (granulocyte-macrophage colony-forming cells), HPP-CFC (high proliferative potential colony-forming cells) und CD34+-Zellen führte.

Piacibello und Mitarbeiter (1999) zeigten das Anwachsen von CD34+-Zellen aus NSB nach *ex vivo* Expansion in NOD-SCID-Mäusen *in vivo*. In einer klinischen Studie wurden bei 37 Patienten mit hämatologischen malignen Erkrankungen unbehandelte und *ex vivo* expandierte Stammzellen aus NSB transplantiert (Shpall et al., 2002). Es wurde eine Korrelation zwischen der Zahl von CD34+-Zellen und dem Anwachsen des Transplantats gefunden; aber insgesamt wurde die Geschwindigkeit des Engraftments nicht beeinflusst.

Jedoch wird die Bedeutung einer *ex vivo* Vermehrung von HSZ dadurch eingeschränkt, dass aufgrund verschiedener Studien die phänotypischen Eigenschaften von HSZ unter dem Einfluss von Zytokinen verändert und das Homing-Verhalten in NOD-SCID-Mäusen beeinträchtigt werden (Bonde et al., 2004 und Ahmed et al., 2004).

1.4.3. *In Vivo* Visualisierung der Wanderung transplantierte Stammzellen

Der Erfolg einer Stammzelltherapie kann dadurch eingeschränkt werden, dass transplantierte CD34+-Zellen vor dem Homing im Knochenmark auch in andere Organe mit Kapillarbett (z.B. Leber, Lunge) wandern und dort aus Mangel an Homing-Faktoren verloren gehen. Deshalb ist es wichtig, die Effizienz der Stammzelltherapie über das „Homing-Verhalten“ von HSZ (Ansiedeln im Knochenmark) *in vivo* zu untersuchen (Bonde et al., 2004).

In einer Studie wurden HSZ mit dem fluoreszierenden Membranfarbstoff PKH26 markiert, langzeit- und kurzzeitrepopulierende HSZ aufgrund ihrer Zellgrösse mittels Durchflusszytometrie voneinander getrennt und auf letal bestrahlte Mäuse transplantiert (Lanzkron et al., 1999). Anschliessend wurden aus Knochenmark und Milz zurückgewonnene PKH26+-Zellen auf neue letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Dabei zeigte sich, dass nur die langzeitrepopulierenden HSZ im Knochenmark das Überleben der sekundären Empfängermäuse und die langfristige Wiederherstellung der Hämatopoese sichern konnten. Das führte zu der Hypothese, dass sich transplantierte Zellen im Knochenmark ansiedeln müssen, um eine dauerhafte Rekonstitution des Blutsystems und linienspezifische Differenzierungen zu ermöglichen. Insgesamt hat diese Technik mit Fluoreszenzfarbstoffen den Nachteil, dass die Fluoreszenz-Detektion und Beurteilung des Homing-Potenzials erst nach dem Töten der Versuchstiere und Aufarbeiten von Gewebeproben erfolgen kann.

Durch die Markierung von HSZ mit eisenoxidhaltigen SPIO Nanopartikeln und die bildgebende MRT-Technik wird es jedoch möglich, die Wanderung von transplantierten HSZ *in vivo* im Xenotransplantations-Modell immundefizienter Mäuse visuell zu verfolgen und das spezifische Homing-Verhalten und Anwachsen verschiedener HSZ-Subpopulationen direkt zu bewerten.

Bei Verwendung von genetischen Markern, Radionukliden und fluoreszierenden Membranfarbstoffen sind Risiken phänotypischer Veränderungen mit Beeinträchtigung der repopulierenden Zellfunktion und radiotoxische Schäden der Zielzellen beschrieben worden (Hacein-Bey-Abina et al., 2004; Fawwaz et al., 1985).

Eisenoxidhaltige Nanopartikel sind dagegen nach der Aufnahme in die Zielzelle biologisch inert (Zhao et al., 2002; Koch et al., 2003) und eignen sich deshalb besonders gut zur Markierung und MR-Bildgebung. Eisenoxidhaltige MR-Kontrastmittel werden bevorzugt für humane Zellen verwendet, weil sie in den Eisenstoffwechsel der Zellen aufgenommen werden und zu keinen toxischen Nebeneffekten führen (Weissleder et al., 1997; Schoepf et al., 1998; Weissleder et al., 1989).

1.4.3.1. Vor- und Nachteile bildgebender Techniken in Bezug auf die Hämatopoese

Im folgenden Kapitel werden verschiedene klinisch angewendete bildgebende Techniken, wie Szintigraphien nach Markierung mit Radionukliden (PET und SPECT), Fluoreszenz-gestützte Methoden (NIRF und FMT), die Biolumineszenz und die MRT (Magnetresonanztomographie) beschrieben, die im Zusammenhang mit der Hämatopoese eine Rolle spielen.

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) beruht auf dem experimentellen Nachweis, dass der Glukosetransport in die Tumorzelle und die Glykolyserate im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe erhöht ist. Da sich mit 18-Fluor markierte Deoxy-D-Glucose (18-F-FDG) besonders schnell und bevorzugt in verschiedenen malignen Tumoren anreichert, ist die 18-F-FDG-PET ein etabliertes bildgebendes Verfahren für die Diagnostik und Verlaufskontrolle von Leber-, Lungen-, Brust- und Pankreastumoren (Bourget et al., 2002).

PET misst die *in vivo* Verteilung eines an FDG gekoppelten Positronenstrahlers (18-Fluor). Beim Zerfall des Radionuklids werden Positronen emittiert, die im Gewebe beim Zusammenstoß mit einem Elektron vernichtet werden. Gleichzeitig werden zwei hochenergetische Photonen freigesetzt, die von dem PET-Scanner gemessen werden (Reader et al., 2001). Zur Messung der *in vivo* Zellwanderung sind ^{18}F -FDG und $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ wegen ihrer kurzen Halbwertszeit ($t_{1/2} = 111$ min bzw. 20 min) weniger geeignet als ^{64}Cu -PTSM (Kupfer 64 – Pyruvaldehyd-bis (N⁴-Methylthiosemicarbazon)), ein β -strahlendes Radionuklid mit moderater Halbwertszeit ($t_{1/2} = 12,7$ h), das die *in vivo* Abbildung der Lymphozytenwanderung in Mäusen für mindestens 20 Stunden mittels PET ermöglicht (Adonai et al., 2002). PET wird auch erfolgreich angewendet, um das Überleben, die Wanderung und Differenzierung von Stammzellen nach einer Transplantation im Herzen (Zhang et al., 2008) und im Gehirn zu bewerten (Kirik et al., 2005).

Mittels SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) ist es möglich, das Schicksal radioaktiv markierter Moleküle im Körper zu verfolgen und so Stoffwechselwege und -funktionen bildlich darzustellen. Ein γ -strahlendes Radionuklid (^{111}In , ^{123}I , ^{201}Tl , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) wird an ein am Stoffwechsel beteiligtes Molekül gebunden und als Radiopharmakon injiziert. Der γ -Zerfall, d.h. die Emission eines einzigen Photons, wird mit stationären und rotierenden Gammakameras zeitlich und räumlich erfasst und in farbkodierten Bildern dargestellt (Shah et al., 2004). Indikationen sind Untersuchungen am Herzen und am Gehirn. SPECT wird nach Markierung mit ^{111}In oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ routinemässig angewendet, um die Leukozytenverteilung und verborgene Entzündungsstellen zu messen (Rennen et al., 2001). Es ist auch möglich, CD34+-hämatopoietische Progenitorzellen mit dem Radionuklid ^{111}In -Oxin zu markieren und das Homing-Verhalten dieser Zellen nach der Transplantation im Myokardinfarkt-Modell der Ratte zu untersuchen (Brenner et al., 2004). Weiterhin wird die Wanderung von mit ^{111}In markierten mesenchymalen Stammzellen zum Myokardinfarkt im Hundemodell mittels SPECT-CT erfolgreich visualisiert (Kraitchman et al., 2005).

Biokompatible Fluoreszenzfarbstoffe mit Emissionswellenlängen im nahen Infrarot-Spektrum (700 – 900 nm) eignen sich besonders für die Abbildung von Zellen in kleinen Tiermodellen (Ntziachristos et al., 2003). Die zugehörige Technik (NIRF oder near infrared fluorescence reflectance imaging) ermöglicht ein maximales Eindringen ins Gewebe und eine minimale Autofluoreszenz vom umliegenden, nicht markierten Gewebe. Mittels FMT (fluorescence-mediated tomography) kann die räumliche quantitative Verteilung von NIR-Fluoreszenzfarbstoffen im Maus-Modell gemessen werden (Ntziachristos et al., 2008). NIR-Fluoreszenzfarbstoffe und Studien zur Visualisierung von HSZ im Xenotransplantations-Modell befinden sich noch in der Entwicklung. Bisherige *in vivo* Untersuchungen von intravenös transplantierten HSZ nach Markierung mit fluoreszierenden Membranfarbstoffen (PKH67 und PKH26) haben den bereits erwähnten Nachteil, dass Gewebeproben post mortem aufgearbeitet werden müssen (Askenasy et al., 2002; Lanzkron et al., 1999).

Die Bildgebung über Biolumineszenz verwendet die Emission von Photonen spezifischer Wellenlängen des sichtbaren Lichts. Sie basiert auf energieabhängigen Reaktionen, die von Luziferasen katalysiert werden. Luziferasen stellen eine Familie von Photoproteinen dar, die während der Umsetzung von Luziferin zum Oxyluziferin in Gegenwart von Sauerstoff und ATP Photonen emittieren (Shah und Weissleder, 2005). Mit dieser Technik wurde die Wanderung neuraler Vorläuferzellen nach Implantation ins Gehirn nackter Mäuse in Richtung experimenteller Tumoren (intrakranieller Gliome) beobachtet (Tang et al., 2003).

Die MRT ermöglicht die Darstellung von Körperstrukturen mit hoher anatomischer Auflösung und hohem Weichteilkontrast. Haupteinsatzgebiete sind u.a. die Diagnostik von Erkrankungen im Bereich des Kopfes, wie Tumoren, Entzündungen oder Zysten und im Bereich der Wirbelsäule. Dieses nicht invasive Verfahren macht sich die magnetischen Eigenschaften des Wasserstoffs zunutze, der in lebendem Gewebe in Wasser und organischen Verbindungen reichlich vorhanden ist.

Das Wasserstoffatom besitzt ein Proton im Kern und ein Elektron auf der Elektronenschale, jedoch kein Neutron im Kern. Aufgrund seiner ungeraden Kernladungszahl verfügt das Wasserstoff-Proton über einen Eigendrehimpuls, den Kernspin. Durch Anlegen eines externen starken statischen Magnetfeldes wird zunächst der Kernspin ausgerichtet. Die Mehrzahl der Wasserstoffkerne bevorzugt das energieärmere Niveau, d.h. die parallele Ausrichtung zum angelegten Magnetfeld. Wird zusätzlich noch ein hochfrequenter elektromagnetischer Impuls zugeschaltet, werden die Protonen aus ihrer Ruhelage ausgelenkt und gehen auf ein höheres Energieniveau über. Nach Abschalten des hochfrequenten Impulses tritt eine Relaxation ein, d.h. der Anteil der Protonen im höheren Energieniveau nimmt ab, weil diese in den energieärmeren Zustand zurückfallen. Dabei wird ein Resonanzsignal abgestrahlt, das im MR-Tomographen als induzierte Wechselspannung gemessen wird. Der Vorgang der Relaxation lässt sich durch zwei Zeitkonstanten T1 und T2 beschreiben (Reiser et al., 2002), die durch die Molekülstruktur des umgebenden Gewebes, d.h. das magnetische Verhalten benachbarter Protein- und Lipidverbände, bestimmt werden. MR-Kontrastmittel verändern das MR-Signal, indem sie die Relaxationseigenschaften der benachbarten Wasserstoffatome beeinflussen (Syková et al., 2009).

Entscheidend für die *in vivo* Visualisierung der Wanderung transplantierte Stammzellen ist die Sensitivität für die Zelldetektion. Markierungstechniken mit Radionukliden (Szintigraphien, wie PET und SPECT) haben den Vorteil eines geringeren Hintergrundsignals und einer dadurch bedingten viel höheren Sensitivität als die MR-Bildgebung (Fawwaz et al., 1985) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Sensitivität verschiedener bildgebender Techniken
(modifiziert nach Gillies, 2002)

Method	Räumliche Auflösung	Zeitliche Auflösung	Sensitivität
MRT	sub-mm	1 – 2 s	mM Gd; nM Fe
PET	mm	s - min	pM Radionuklid
SPECT	sub-mm	min	sub-nM Radionuklid
Fluoreszenz	µm	ms	pM
Biolumineszenz	mm	min	ca. 100 Zellen / Voxel

Jedoch trotz hoher Sensitivität ist die räumliche Auflösung bei der Szintigraphie eingeschränkt. Zudem ist der Beobachtungszeitraum für Verlaufsstudien durch die Halbwertszeit des Radionuklids limitiert, weil das bildgebende Signal mit dem radioaktiven Zerfall abnimmt. Hohe Dosen von Radionukliden können auch für die Zellen toxisch sein (Fawwaz et al., 1985). Die MRT mit SPIO zeigt dagegen keine toxischen Nebenwirkungen und erlaubt trotz relativ niedriger Sensitivität eine Bildgebung mit hoher anatomischer Auflösung und sehr gutem Weichteilkontrast (Barkhausen et al., 2001 und Choi et al., 1997).

Fluoreszenz-gestützte Techniken sind allen übrigen bildgebenden Methoden nicht nur im Hinblick auf die Sensitivität sondern auch auf die räumliche und zeitliche Auflösung deutlich überlegen (Tabelle 1). NIRF in Verbindung mit FMT stellt eine vielversprechende bildgebende Technik zur *in vivo* Visualisierung transplantierter Stammzellen dar.

1.4.3.2. Kontrastmittel und Markierungsmethoden für MRT

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die MR-Bildgebung als nicht invasive Methode, um die Verteilung transplantierter HSZ im Xenograft-Modell immundefizienter Mäuse *in vivo* zu verfolgen.

In früheren Studien wurden einerseits verschiedene hämatopoetische Zellpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Vorläuferzellen und embryonale Zellen) mit MR-Kontrastmitteln markiert (Lewin et al., 2000; Weissleder et al., 1997; Högemann et al., 2000; Yeh et al., 1995; Schoepf et al., 1998) und andererseits Markierungstechniken mit verschiedenen MR-Kontrastmitteln untersucht (Daldrup-Link et al., 2003; Frank et al., 2003; Arbab et al., 2005). Erste Markierungstechniken waren unzureichend, weil nur eine limitierte Konzentration von Kontrastmittel in HSZ aufgenommen wurde mit der Konsequenz einer eingeschränkten Sensivität der MRT. Man versuchte dieses Problem zu lösen, indem man MR-Tomographen mit sehr hohen magnetischen Feldstärken bis 14 T verwendete (Lewin et al., 2000). Alternativ wurden mit Kontrastmittel markierte HSZ direkt in das Zielorgan gespritzt, um so die Konzentration des Kontrastmittels zu erhöhen (Bulte et al., 2001).

Eine Arbeitsgruppe hat humane hämatopoetische Progenitorzellen aus NSB mit verschiedenen MR-Kontrastmitteln, wie Eisenoxid, Eisenoxtran, magnetischem Polysaccharid Nanopartikel-Transferrin, P7228 Liposomen und Gadopentetat-Dimeglumin Liposomen *ex vivo* markiert und die Daten der MR-Bildgebung verglichen (Daldrup-Link et al., 2003). Für alle Kontrastmittel wurde eine intrazelluläre Aufnahme elektronenmikroskopisch nachgewiesen und spektrometrisch quantifiziert. Hämatopoetische Progenitorzellen aus NSB konnten mit allen Kontrastmitteln markiert und in einem klinisch relevanten MR-Tomographen (1,5 T) mit einem minimalen Detektionslimit von 1.0×10^5 Zellen visualisiert werden.

Daldrup-Link und Mitarbeiter (2005a) fanden zum erstenmal eine Methode, um die *in vivo* Verteilung von intravenös gespritzten humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen auf verschiedene Zielorgane mit Hilfe von klinisch eingesetzten MR-Tomographen (1,5 T) und Kontrastmitteln (SPIOs oder superparamagnetic iron oxide particles) darzustellen, welche für die Abbildung der Leber nach i.v. Infusion klinisch zugelassen sind (Ferrucci und Stark, 1990).

Diese von Dextran umgebenen SPIO-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 100 – 150 nm werden von humanen Stammzellen aufgrund ihrer negativen Oberflächenladung nur unzureichend aufgenommen. Mit Hilfe von polykationischen Transfektionsagenzien (TA), die über elektrostatische Wechselwirkungen Komplexe mit Dextran bilden, können SPIO in Zellen eingeschleust und die Effizienz der Markierung erhöht werden.

Verschiedene Autoren haben unabhängig voneinander effektive Markierungstechniken unter Verwendung von polykationischen Transfektionsagenzien (Transferrin, Poly-L-Lysin (PLL), Protaminsulfat, Lipofektamin) und klinisch relevanten SPIO-Nanopartikeln entwickelt (Daldrup-Link et al., 2003; Rudelius et al., 2003; Frank et al., 2003; Arbab et al., 2004a und 2005). Wenige Studien haben bisher die Lebensfähigkeit und das Differenzierungspotenzial verschiedener HSZ (Progenitorzellen und Stammzellen) nach Markierung mit eisenhaltigen Kontrastmitteln untersucht. Dabei zeigten Progenitorzellen aus NSB und peripherem Blut keine gravierenden kurzfristigen funktionellen Veränderungen (nach 2h – 14d) (Daldrup-Link et al., 2003; Hinds et al., 2003). Auch in humanen mesenchymalen Stammzellen hatte die Markierung mit Eisenoxid-PLL-Komplexen keine kurz- oder langfristigen Effekte auf die Lebensfähigkeit, das Wachstum und die Geschwindigkeit der Apoptose (Arbab et al., 2003).

Arbab und Mitarbeiter (2005) untersuchten den Einfluss der Markierung mit SPIOs und Protaminsulfat (FePro) auf die Lebensfähigkeit, phänotypische Eigenschaften und das Differenzierungspotenzial von CD34⁺-HSZ aus NSB und peripherem Blut und verglichen diese Daten mit nicht markierten Kontrollen. Colony-forming unit (CFU)-Tests zeigten eine äquivalente Differenzierungskapazität für markierte und nicht markierte HSZ aus peripherem Blut. Anhand morphologischer Untersuchungen liess sich unter geeigneten Kulturbedingungen auch für markierte und nicht markierte HSZ aus NSB nach maximal 6 Tagen ein ähnliches Differenzierungsmuster zu dendritischen Zellen beobachten.

Darüber hinaus zeigten sich durch die Markierung von HSZ in NSB und peripherem Blut mittels Durchflusszytometrie keine kurzfristigen Veränderungen in der Expression von phänotypischen Oberflächenmarkern (CD34, CD31, CXCR4, CD20, CD3 und CD14).

Eine weitere Studie vergleicht die Markierung humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen aus NSB und peripherem Blut mit SPIO/ Lipofectamin im Hinblick auf eine *in vivo* MR-Bildgebung nach i.v. Applikation in immundefizienten Balb/c-Mäusen (Daldrup-Link et al., 2005b). Progenitorzellen aus NSB zeigten eine deutlich höhere Aufnahme von SPIOs im Vergleich mit entsprechenden Zellen aus peripherem Blut und konnten durch einfache Inkubation mit SPIOs effizienter markiert werden. Progenitorzellen aus peripherem Blut benötigten zur Markierung mit SPIOs zusätzlich das Transfektionsagens Lipofectamin, um mittels MRT visualisiert zu werden. Eine signifikante Abnahme der Signalintensität der MR-Bildgebung wurde in Leber, Milz und Knochenmark 24 Stunden nach der Injektion markierter Zellen beobachtet ($p < 0,05$).

1.5. Ziele der Arbeit

MR-Kontrastmittel wie SPIOs können zur Markierung hämatopoetischer Progenitorzellen benutzt werden, um im Xenotransplantations-Modell immundefizienter Mäuse die Wanderung transplantierte Zellen, das „Homing“ im Knochenmark, die Differenzierung unreifer Zellen und die Abstoßung des Transplantats *in vivo* zu beurteilen (Lewin et al., 2000; Weissleder et al., 1997). Alle bisher bekannten Markierungstechniken befinden sich im präklinischen Stadium. Die klinische Anwendung im Zusammenhang mit Stammzelltransplantationen schließt negative Einflüsse der Markierung auf funktionelle Eigenschaften der Zielzellen, wie das Homing- und Wachstums- sowie das Differenzierungspotenzial, aus. Durch neue *in vitro* Untersuchungen können bisherige Befunde zu klinisch relevanten Markierungstechniken erweitert werden.

Die vorliegende Arbeit verfolgte das erste Ziel, angereicherte CD34+-Vorläuferzellen aus NSB mit zwei verschiedenen SPIO-haltigen MR-Kontrastmitteln (Resovist und Endorem) zu markieren. Ein Problem der bisherigen Methode ist es, dass solche CD34+-Stammzellen die Kontrastmittel nicht direkt aufnehmen (Daldrup-Link et al., 2003). Deshalb sollten die Kontrastmittel mit Hilfe von lipidmodifizierenden Reagenzien (Lipofektin) in die CD34+-Zellen hinein transduziert werden. Dabei könnte aber deren hämatopoetische Funktion beeinträchtigt werden. Daher war das zweite Ziel der Arbeit, das Wachstums- und Differenzierungspotenzial *in vitro* über einen Zeitraum von maximal 12 Wochen („extended long-term cultures“) zu vergleichen. Auf diese Weise sollten die Vor- und Nachteile dieser MR-Kontrastmittel untersucht werden.

Ein drittes Ziel war zu untersuchen, ob die Markierung der CD34+-Zellen das Überleben der funktionellen HSZ beeinträchtigt. Daher wurden Änderungen der Expression bestimmter an der Regulation des HSZ-Überlebens beteiligter Proteine, wie NF κ B, I κ B, Survivin und Bcl-2, mittels Western Blot analysiert. Der ubiquitär vorhandene Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein zentraler Regulator der transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Gene, die an Zelladhäsion, Immun- und Entzündungsreaktion, Differenzierung, Wachstum und der für diese Studie wichtigen Apoptose beteiligt sind (Jobin und Sartor, 2000). Als endogener zytoplasmatischer Inhibitor reguliert I κ B die Aktivierung von NF κ B durch Komplexbildung mit dem Transkriptionsfaktor. Survivin greift als Krebsgen und Inhibitor der Apoptose in verschiedene Signalübertragungswege ein und beeinflusst das Zellwachstum und -überleben sowie die zelluläre Stressantwort (Altieri, 2006). Bcl-2 Proteine sind ebenfalls kritische Regulatoren von Apoptose und Zelltod (Cory et al., 2003).

2. Methoden

2.1. Gewinnung mononukleärer Stammzellen

Humanes Nabelschnurblut wurde nach normaler Schwangerschaft, Geburt und Abnabelung des Neugeborenen entnommen unter der Voraussetzung, dass ein schriftliches Einverständnis der werdenden Mutter vorlag. Die Studiendurchführung wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München geprüft und ethisch, wissenschaftlich und berufsrechtlich für unbedenklich erklärt.

Mononukleäre Stammzellen wurden durch Zentrifugation im Ficoll-Dichtegradienten isoliert (Dichte von Ficoll: 1.077 g/cm³; Biochrom AG, Berlin). Während einer 30minütigen Zentrifugation bei 2000 U/min ohne Bremse wandern Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und tote Zellen nach unten. Mononukleäre Zellen reichern sich in einer Schicht zwischen Ficoll und Plasma an.

Da für die Versuche grosse Zellmengen nötig waren, wurden die gewonnenen mononukleären Zellen nach einmaligem Waschen in einem Pool von durchschnittlich 10 Nabelschnurblutspenden in 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, St Louis, MO) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kryokonserviert und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die nachfolgenden Experimente wurden die Zellen von 10 Nabelschnurblutspenden nach Zugabe von 30 ml kaltem HF/2+-Puffer (Hank's balanced salt solution; Invitrogen, Berlin) im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Danach wurden die Zellen auf Eis gelagert und 5 Minuten bei 1400 U/min abzentrifugiert. Um ein Verklumpen der Zellen durch freigesetzte DNA aus abgestorbenem Zellmaterial zu verhindern, wurde das Zellpellet anschliessend 5 Minuten bei 37 °C mit DNase inkubiert (100 Kunitz Units / 100 µl DNase pro 1 x 10⁸ Zellen) und homogenisiert.

Für die Zellzählung wurde das Zellpellet je nach Grösse in 30 – 50 ml HF/2+-Puffer suspendiert und 1 : 10 verdünnt. Schliesslich wurden 20 µl Zellen mit gleichem Volumen einer Trypanblau-Lösung in den 4 grossen Eckquadraten der Thoma-Zählkammer ausgezählt.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen} \times a \times b}{c}$$

a = Blutverdünnungsgrad (20 bei Verdünnung 1 : 20)

b = Multiplikationsfaktor, um die gegebene Schichthöhe von 0,1 mm auf 1 mm hochzurechnen (konstanter Faktor 10)

c = Anzahl der ausgezählten grossen Quadrate.

2.2. Isolation von CD34+-Zellen

2.2.1. Grundprinzip der Methode

CD34+-Zellen werden isoliert durch magnetische Säulenseparation mittels monoklonaler Maus-Anti-Mensch-CD34-Antikörper, welche an supramagnetische Partikel (MACS[®] „Microbeads“) gebunden sind (siehe Abb.2).

QuadroMACS™ Separator



MACS® Separation Columns



Abb.2: Magnetische Säulenseparation

Bei einer MACS®-Zellisolierung werden Zellen einer Suspension mittels ihrer Oberflächenmarker (CD34) aufgereinigt. Die Oberflächenrezeptoren werden mit spezifischen Antikörpern, im Falle von Stammzellen mit Anti-CD34, markiert. Diese monoklonalen Antikörper sind zusätzlich mit supramagnetischen Partikeln, MACS® „Microbeads“, gekoppelt. Nach dieser Oberflächenmarkierung passieren die Zellen eine Auftrennungssäule. Die markierten Zellen werden vom Magneten angezogen und bleiben in dieser Säule hängen, während die unmarkierten Zellen der Suspension vom Magneten nicht beeinflusst werden und durchfließen. Nach Entfernen des Magneten finden die aufgereinigten Zellen in der Auftrennungssäule keinen Halt mehr und können herausgewaschen werden. Die Anreicherung von CD34+-Zellen über magnetische Säulenseparation führte zu einer Reinheit von über 95 %.

2.2.2. Protokoll der Markierung

Im ersten Schritt wurden die Zellen mit Hilfe des MACS[®] Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) markiert. Dazu wurde die Zellsuspension nach Anleitung mit 200 µl HF/2+-Puffer, 100 µl Block-Reagenz (MACS[®]) und 100 µl Micro Beads (MACS[®]) gemischt und 30 Minuten auf dem Schüttler im Kühlschrank inkubiert. Anschliessend wurden 30 ml kalter HF/2+-Puffer zugesetzt und die Zellen 5 Minuten bei 1400 U/min abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 3 ml kaltem HF/2+-Puffer aufgenommen und homogenisiert.

2.2.3. Protokoll der Säulenseparation

Nach dem Spülen der magnetische Säule mit 3 ml kaltem HF/2+-Puffer wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Nach einem Durchlauf wurde die Säule dreimal mit je 1 ml kaltem HF/2+-Puffer gewaschen. Das Durchdrücken durch die Säule lieferte folglich insgesamt 5 ml Zellen. Dieses erste positive Eluat entsprach einer unreinen CD34+-Fraktion und wurde im ersten positiven Röhrchen gesammelt. Wiederholtes Waschen und Eluieren der Säule führte schliesslich zu einer hoch gereinigten Fraktion von CD34+-Zellen im zweiten positiven Röhrchen. Für die weitere Aufarbeitung wurden beide Fraktionen aufgereinigter CD34+-Zellen vereinigt.

2.3. Markierung mit Kontrastmittel für MR-Bildgebung

Um die Vor- und Nachteile von zwei MR-Kontrastmitteln zu untersuchen, wurden gereinigte CD34+-Zellen mit zwei verschiedenen SPIO-haltigen Kontrastmitteln, Resovist (Bayer Schering Pharma AG, Berlin) und Endorem (Guerbet S.A., Roissy, Frankreich) markiert.

Resovist ist ein klinisch zugelassenes von Carboxydextran umhülltes SPIO mit einem durchschnittlichen hydrodynamischen Durchmesser von 60 nm. Seine Eisenoxidpartikel haben eine R1-Relaxationskonstante von $9,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und R2-Relaxationskonstante $189 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1,5 T. Endorem ist ein von Dextran umhülltes Eisenoxid. Seine Partikelgrösse beträgt 120–180 nm. Die Partikel haben eine R1-Relaxationskonstante von $10,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und R2-Relaxationskonstante von $120 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1,5 T.

Zum effektiven Markieren von CD34+-Zellen mit SPIO wurde das polykationische Transfektionsagens Lipofektin (Invitrogen, Berlin) eingesetzt. Pro Kontrastmittel wurden drei Experimente durchgeführt:

1. Zellen ohne Kontrastmittel (1. Kontrolle)
2. Mit Lipofektin behandelte Zellen (2. Kontrolle)
3. Mit Lipofektin und Resovist oder mit Lipofektin und Endorem markierte Zellen.

Zunächst wurde jeweils das Kontrastmittel (Resovist oder Endorem) in einer Dosis von $20 \text{ } \mu\text{g Fe}$ bzw. Lipofektin ($12 \text{ } \mu\text{l}$) in einem Gesamtvolumen von $100 \text{ } \mu\text{l}$ HF/2+-Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Komplexbildung und Markierung wurden die Ansätze mit Kontrastmittel und Lipofektin vereinigt, auf ein Endvolumen von 2 ml HF/2+-Puffer aufgefüllt, 1×10^6 CD34+-Zellen zugegeben und wiederum 20 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte eine Inkubation der markierten Zellen für 4 Stunden unter Standardbedingungen der Zellkultur ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5 \text{ } \%$ CO_2). Die Zellproben wurden anschliessend mindestens dreimal mit HF/2+-Puffer gewaschen, um restliche Partikel der Kontrastmittel zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in $0,3 \text{ ml}$ HF/2+-Puffer resuspendiert und durch ein $30\text{-}\mu\text{m}$ Filcon Filter (BD Immunocytometry Systems, Erembodegem, Belgien) gefiltert, um eine Zellagglutination zu vermeiden.

Schliesslich wurden unmarkierte und markierte CD34⁺-Zellen 12 Wochen lang unter Standardbedingungen der Zellkultur (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Feuchtigkeit) auf Petrischalen gezüchtet, um ihre funktionelle Kapazität (Wachstums- und Differenzierungspotenzial) langfristig zu vergleichen.

2.4. Kolonie-bildende Vorläuferzellen und deren Regulation durch CSF

Die Proliferation und Differenzierung hämatopoietischer Vorläuferzellen wird durch hämatopoietische Wachstumsfaktoren oder Zytokine reguliert. Diese Mediatoren werden auch als Kolonie-stimulierende Faktoren (colony stimulating factors oder CSF) nach der Zielzelle benannt, auf die sie wirken. So unterscheidet man das Multi-CSF (IL-3), Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF), Granulozyten-CSF (G-CSF), Makrophagen-CSF (M-CSF), das Erythropoietin (EPO, ESF = erythropoiesis stimulating factor) und das Thrombopoietin (TPO). Als Glykoproteine wirken die meisten CSF bereits in niedrigen Konzentrationen (ca. 10⁻¹² M) durch Bindung an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche (Schartl et al., 2009). GM-CSF bindet z.B. an einen hochaffinen Rezeptor, der u.a. auf reifen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden kann.

Aus den am frühesten nachweisbaren myeloischen Vorläuferzellen entwickeln sich Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten; sie werden als CFU-GEMM (colony forming unit granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte) bezeichnet (siehe Abb.3). Unter dem Einfluss von IL-3, GM-CSF und SCF entstehen auf dem myeloiden Entwicklungsweg zunächst die CFU-GM, die später entweder über das Stadium der Monozyten in die Makrophagen oder in die neutrophilen Granulozyten differenzieren. Die basophilen und eosinophilen Granulozyten entwickeln sich über CFU-Baso und CFU-Eo. Auf dem erythroiden Differenzierungsweg bilden sich über „burst forming units erythroid“ (BFU-E) Erythroblasten und schliesslich reife Erythrozyten.

Die Proliferation der BFU-E wird ausschliesslich durch EPO gesteuert, das *in vivo* und *in vitro* u.a. für die Hämoglobinsynthese benötigt wird.

Andere CSF haben dagegen ein breites Wirkungsspektrum, wie das IL-3, der Stammzellfaktor (SCF) und Thrombopoietin (TPO). Sie greifen sowohl in die frühen Phasen der Hämatopoese als auch in deren späteren Verlauf ein.

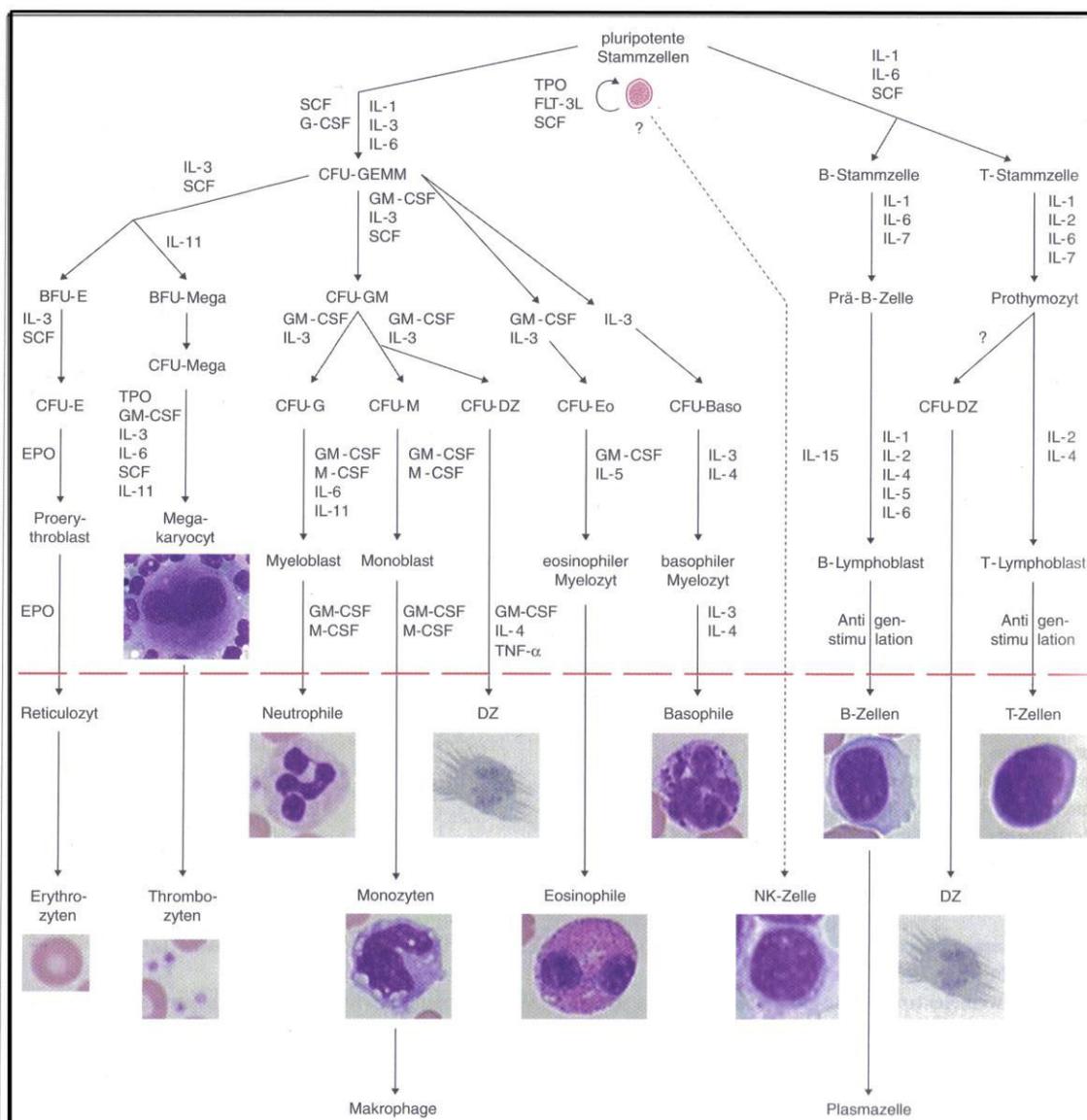


Abb.3: Hämatopoietische Entwicklung und regulierende Wachstumsfaktoren nach Scharf, Gessler und von Eckardstein, 2009
 CFU (colony forming units oder determinierte Stammzellen); IL Interleukin
 SCF Stammzellfaktor; GM Granulozyten und Monozyten; EPO Erythropoietin
 TPO Thrombopoietin; DZ Dendritische Zelle

Während IL-3 eine proliferationssteigernde Wirkung auf multipotente Stammzellen und die meisten determinierten Vorläuferzellen hat, beeinflusst GM-CSF bipotente Vorläuferzellen und bewirkt M-CSF die Ausreifung von Monozyten und Makrophagen. GM-CSF wird von T-Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen freigesetzt und stimuliert das Wachstum von Granulozyten- und Makrophagenkolonien.

Neben dem Einfluss auf das Wachstum von Progenitorzellen und deren Differenzierung können CSF auch die Lebenszeit und die Funktion der ausgereiften Blutzellen regulieren. So potenziert GM-CSF die Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten, deren antimikrobielle Aktivität (Phagozytose) und die Produktion von Zytokinen.

2.5. *In-Vitro*-Messung des Wachstums- und Differenzierungspotenzials hämatopoietischer Vorläuferzellen auf Methylzellulose

Experimentell lassen sich CD34+-Progenitorzellen und ihr Entwicklungspotenzial in „Colony Forming Assays“ durch ihre Fähigkeit nachweisen, in Kultur Kolonien zu bilden. In dieser Studie kam die Methylzellulose-Technik zur Anwendung, die von Iscove entwickelt wurde (Iscove et al., 1971). Ein spezielles Medium (MethoCult™ H4434 s.u.; Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada), das Methylzellulose, verschiedene Wachstumsfaktoren und eine besondere Kombination von Nährstoffen enthält, ist optimal für das Wachstum erythroider und myeloider Kolonien (Human Hematopoietic Colonies in Health and Disease, 2005). Hier bilden sich nach ca. 10 Tagen aus jeweils einer Progenitorzelle „Colony-forming Units“ (CFU) und nach 14 Tagen „Burst-Forming Units“ (BFU).

MethoCult™ H4434-Medium zur Erfassung der hämatopoietischen Koloniebildung:

- 1 % Methylcellulose in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)
- 30 % Fötale Kälberserum (FCS)
- 1 % Rinderserumalbumin (BSA)
- 10^{-4} M 2-Mercaptoethanol
- 2 mM L-Glutamin
- 50 ng/ml SCF
- 10 ng/ml GM-CSF
- 10 ng/ml IL-3
- 3 Units/ml EPO
- 70 % IMDM

CD34+-Stammzellen wurden ausgesät (250 Zellen und 250 µl IMDM-Lösung (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe)) in 1 ml Methylcellulose-Medium (MethoCult™ H4434). Sie wurden auf 35 mm Petrischalen unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Feuchtigkeit) im Brutschrank gezüchtet und die Zellkolonien nach 14 Tagen Inkubation im Lichtmikroskop nach Standardkriterien ausgezählt (siehe Tabelle 2).

Erythroide Kolonien wurden bestimmt als Zahl der „burst forming unit erythroid“ (BFU-E) und der „colony forming unit erythroid“ (CFU-E). Gemischte Kolonien wurden detektiert als Zahl der „colony-forming units of granulocyte / erythroid / macrophage / megakaryocyte“ (CFU-GEMM), d.h. Kolonien, die einen beträchtlichen Anteil von erythroiden und myeloiden Nachkommen enthalten. Myeloide Kolonien wurden schliesslich erfasst als Zahl der „colony-forming units of granulocyte / macrophage“ (CFU-GM), die nur myeloide Zellen enthalten.

Kolonie-Auswertung

CFU-E	8-200 Zellen in 1-2 Clustern
BFU-E	> 200 Zellen in 3 bis mehr als 16 Cluster
CFU-G	> 20-40 Granulozyten in einer Kolonie
CFU-M	> 20 Monozyten in einer Kolonie

CFU-GM	Kolonie enthält Granulozyten und Monozyten
CFU-GEMM	Kolonie enthält erkennbar hämoglobinisierte Erythroblasten und Granulozyten und Monozyten und Megakaryozyten (Oostendorp, 2005)

Tabelle 2: Normalwerte der Kolonien (nach Oostendorp, 2005)

Vorläufer	KM per 1×10^5 (kernhaltige Zellen)	PB per 2×10^5 (kernhaltige Zellen)	CB per 2×10^4 (kernhaltige Zellen)
CFU-E	2 – 289	n.b.	n.b.
BFU-E	14 - 658	9 - 302	9 – 158
CFU-GM	34 – 267	9 – 92	6 – 340
CFU-GEMM	0,4 – 34	0,2 – 39	0,2 - 90

Die Daten stellen auf Methylzellulose-Basis nachgewiesene Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Experimenten dar. KM: Knochenmark; PB: Peripheres Blut; CB: „Cord Blood“ oder Nabelschnurblut; n.b.: nicht bestimmt.

2.6. *In-Vitro*-Messung des Wachstumspotenzials hämatopoietischer Vorläuferzellen in Langzeitkulturen

In frühen Kulturen (nach 2 Wochen) und in Langzeitkulturen (nach 6, 8, 10 und 12 Wochen) wurde auch die Frequenz von kopfsteinpflasterbildenden Kolonien (cobble-stone area-forming cells oder CAFC) bestimmt, wie früher beschrieben (Breems et al., 1994) und das Potenzial von markierten Zellen mit demjenigen von Kontrollen verglichen. Dafür wurden CD34+-Zellen in CAFC-Medium (siehe unten) kontinuierlich auf 96 Well-Platten gezüchtet und die Frequenz von CAFC im Abstand von jeweils 2 Wochen im Lichtmikroskop ausgezählt.

Konfluente Schichten von FBMD-1-Stromazellen auf 96-Well-Platten (mit 0,1 % Gelatine-Überzug) wurden überschichtet mit markierten und unmarkierten CD34+-Zellen in vier unterschiedlichen Verdünnungen mit mehreren Replikaten pro Verdünnung. Die Kulturen wurden halbiert und pro Woche mit frischem Medium versetzt (IMDM mit 20 % FCS, 20 ng/ml G-CSF, 10 ng/ml IL-3. Nach einer Langzeitkultur von 2, 6, 8, 10 und 12 Wochen wurde die Frequenz von CAFC im Lichtmikroskop ausgezählt und unter Verwendung des L-Calc-Programms (Stem Cell Technologies) ausgewertet.

CAFC-Medium: 20 % fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert 56 °C)

80 % IMDM mit Glutamax I

Penicillin / Streptomycin 1 : 100 oder Gentamycin 1 : 200

10 µM β-Mercaptoethanol

1 µM Hydrocortison

20 ng/ml G-CSF

10 g/ml IL-3

2.7. Kontrolle von Reinheit und Apoptoseanteil mittels Durchflusszytometrie

Nach Prüfung der Reinheit von CD34+-Zellen wurde ihr Apoptoseanteil vor und nach der Markierung mit Kontrastmittel mittels Durchflusszytometrie beurteilt.

Prinzip der Durchflusszytometrie:

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom (Darzynkiewicz et al., 1994, Radbruch, 2000). Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren.

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse; FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet (Abb.4). Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern / Zelle. Zusätzlich ändert das Licht des Laserstrahls beim Auftreffen auf die Zelle seine Richtung und es entsteht Vorwärtsstreulicht (forward scatter oder FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter oder SSC). Mittels FSC wird die Zellgröße bestimmt, während SSC ein Mass für die Granularität der Zelle darstellt.

Die gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

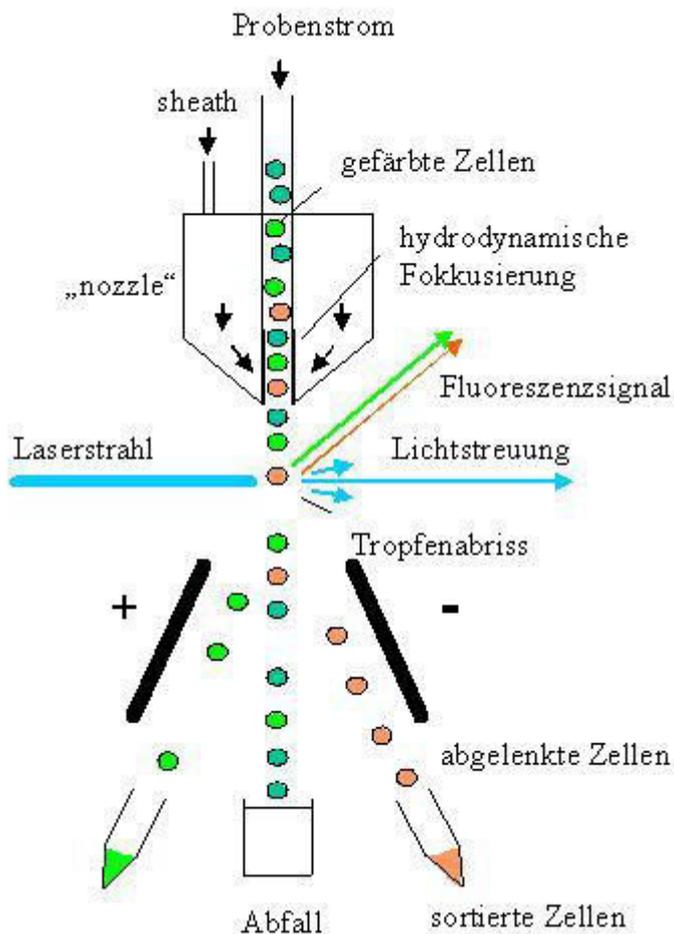


Abb.4: Schematische Darstellung eines Sortiervorganges von markierten Zellen nach Radbruch, 2000

Die Reinheit der hier verwendeten CD34⁺-Zellen (2.2.2.1.) wurde durchflusszytometrisch erfasst nach Färbung mit Fluorochrom-konjugiertem CD34-Antikörper (CD34-PE) oder CD45-Antikörper (CD45-FITC).

Protokoll:

Gereinigte CD34⁺-Zellen wurden 5 Minuten lang bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml FACS-Puffer (PBS (phosphate-buffered saline) + 5 % BSA) gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren in 0,1 ml FACS-Puffer resuspendiert.

Schliesslich wurden die Zellen mit 1 µl der oben angegebenen Antikörper (1:100 verdünnt) 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert, mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert und das Pellet zur Messung in 500 µl FACS-Puffer mit Propidiumiodid resuspendiert. Die Anreicherung von CD34+-Zellen über magnetische Säulenseparation führte zu einer Reinheit von über 95 %.

Zum Nachweis des Apoptoseanteils der Zellen wurde mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiertes Annexin V und Propidiumiodid eingesetzt. Die Methode kombiniert die Eigenschaft von Annexin V, in der frühen Phase der Apoptose an Phosphatidylserin der Zellmembran zu binden mit der Färbung durch Propidiumiodid, das nach Verlust der Membranintegrität zwischen Basenpaare doppelsträngiger Nukleinsäuren interkaliert und damit tote Zellen nachweist.

Protokoll:

CD34+-Zellen wurden vor und nach der Markierung mit MR-Kontrastmittel mit (FITC)-markiertem Annexin V nach Herstelleranleitung gefärbt (Caltag Laboratories, Bayshore Blvd, Burlingame, Kanada). Im Einzelnen wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1400 U / min gesammelt und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 5 µl Annexin V und 5 µl Propidiumiodid (1 µg / ml; Invitrogen, Berlin) in 500 µl Annexinpuffer (siehe unten) gut gemischt und 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Die Detektion der Apoptoserate erfolgte mittels Flowzytometrie (Flowzytometer von Beckman Coulter, Deutschland) und die Auswertung der Messdaten mit Hilfe der FlowJo-Software (Tree Star, Ashland, OR, USA). Tote Zellen wurden unter Verwendung des DNA-Farbstoffs Propidium-Jodid gemessen.

Annexinpuffer: 10 mM HEPES pH 7,4; 140 mM NaCl; 3,2 mM CaCl₂

2.8. Zellyse und Proteinbestimmung

Lysis-Puffer: 50 mM Tris HCl pH 7,5
650 mM NaCl
25 mM EDTA pH 8,0
5 % (w/v) Triton X100
20 mM Phosphatpuffer pH 7,0
100 mM Na-Pyrophosphat pH 7,5
50 mM NaF
50 µM Benzamidin
50 µM PMSF (Phenyl-methyl-sulfonyl-flourid)
1 mM Orthovanadat (MG 183 g)
Protease Inhibitor

Vor der Proteinbestimmung mussten die gereinigten CD34+-Zellen lysiert werden. Nach Abzentrifugieren der Zellen ($5 - 10 \times 10^6$ Zellen) und dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet je nach Grösse mit Lysis-Puffer (20 – 200 µl) versetzt, mit der Pipette gut durchmischt und in Eppendorfgefässe überführt. Die Proben wurden für mindestens 20 Minuten im Eisbad inkubiert, zwischendurch auf dem Vortex geschüttelt und anschliessend 20 Minuten bei 14 000 U / min und 4 °C abzentrifugiert. Da sich die Proteine der lysierten Zellen im Überstand befanden, wurde der Überstand für den Proteintest aufbewahrt und das Pellet verworfen.

Reagenz A: 100 mg Coomassie Blue G-250, 50 ml Ethanol, 100 ml 85 % H_3PO_4
(bei 4 ° C lagern)

Reagenz B: 3 ml Bradford A ad 20 ml (frisch ansetzen)

Reagenz S:

Der Proteintest nach Bradford (Bradford, 1976) wurde als Doppelbestimmung auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Als Proteinstandard diente BSA.

Nach Herstellung einer Proteinstandardreihe (0; 3; 1,5; 0,75; 0,375; 0,188 und 0,094 mg/ml BSA) in Lysis-Puffer wurden die vorbereiteten Proben, abhängig von der Proteinkonzentration verdünnt und davon je 5 µl pro Well pipettiert. Zu allen Proben und Proteinstandards wurden zuerst 25 µl einer Mischung aus Reagenz A und Reagenz S (2 ml + 40 µl) zugegeben und danach 200 µl Reagenz B. Die Mikrotiterplatte wurde anschliessend 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die OD bei 750 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte gegen die BSA-Eichreihe unter Berücksichtigung der Verdünnung. Das Proteinlysate wurde aliquotiert und für nachfolgende Westernblot-Analysen bei -80 °C aufbewahrt.

2.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wandern im elektrischen Feld entsprechend ihrer Nettoladung und werden in der SDS-PAGE in denaturierter Form nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Grundsätzlich ist die Bewegungsgeschwindigkeit der Proteine, außer von der Nettoladung bei einem bestimmten pH, noch abhängig von der Teilchenform und -größe, der Temperatur, dem mechanischen Widerstand des umgebenden Mediums und dem angelegten elektrischen Feld. Bei der Denaturierung mit dem anionischen Tensid SDS wird die Sekundär- und Quartärstruktur des Proteins aufgebrochen. SDS lagert sich infolge hydrophober Wechselwirkungen an Proteine in einem durchschnittlichen Verhältnis von 1,4 mg SDS / mg Protein an. So entstehen Partikel gleichförmiger Gestalt mit zur Masse proportionalen negativen Ladung und gleicher Bewegungsgeschwindigkeit. Eine weitere Auffaltung des Proteins erfolgt durch reduktive Spaltung von Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol und DTT. In einem Polyacrylamidgel werden denaturierte Proteine aufgrund des Molsiebeepekts nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins vergleicht man die zu einer bestimmten Zeit zurückgelegte Strecke bzw. die relative Wanderungsstrecke (R_f –Wert) mit der von Proteinen bekannten Molekulargewichts (Proteinstandard).

$$R_f = \frac{\text{Wanderungsstrecke}_{\text{Protein}}}{\text{Wanderungsstrecke}_{\text{Elektrophoresefront}}}$$

In einem Koordinatensystem werden die R_f -Werte gegen den Zehnerlogarithmus des Molekulargewichts aufgetragen ($R_f = f(\lg \text{Molekulargewicht})$) und das Molekulargewicht des gesuchten Proteins ermittelt.

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach der Methode von BIORAD Mini-Protean_(Biorad, München) unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Lösungen:

Acrylamid / BIS: Ultra Pure Protogel (National Diagnostics, Atlanta, USA)

(30 % (w/v) Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid Stroke Solution)

APS 10 %: 10 % APS (w/v) in H_2O frisch ansetzen

Tris-Puffer pH 6,8: 0,25 M Tris-Base in H_2O lösen, mit konz. HCL auf pH 6,8 einstellen

Tris-Puffer pH 8,8: 0,75 M Tris-Base in H_2O lösen, mit konz. HCL auf pH 8,8 einstellen

Methanol: 100 %

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris-HCL

(Laufpuffer) 192 mM Glycin

0,1 % SDS (sodium dodecyl sulfate) (w/v) in H_2O lösen, pH stellt sich auf ca. 8,8 ein

5-fach Beladungspuffer: 625 mM Tris-Base
 10 % SDS (w/v)
 50 % Glycerin
 5 mM DTT
 25 mg Pyronin / 100 ml
 in H₂O lösen (heiß rühren), pH 6,9 einstellen
 (bei -20 °C lagern)

2-fach Beladungspuffer: 60 mM Tris-HCl pH 6,8
 3 % SDS (w/v)
 10 % Glycerin (v/v)
 10 % 2-Mercaptoethanol (v/v)
 0,05 % Bromphenolblau (v/v)
 mit H₂O auffüllen und lösen

Proteinmarker: Precision Plus Protein Dual Color Standards
 (Biorad, München)
 20 / 25 / 37 / 50 / 75 / 100 kDa-Proteine

Herstellung des Elektrophoresegels

Trenngel

	14 %	8 %
Acrylamid / BIS	1,86 ml	1,06 ml
Tris-Puffer pH 8,8	1,00 ml	1,00 ml
H ₂ O	1,13 ml	1,94 ml
APS 10 %	17 µl	17 µl
TEMED	3 µl	3 µl

Sammelgel

	4 %
Acrylamid / BIS	0,260 ml
Tris-Puffer pH 6,8	0,505 ml
H ₂ O	1,235 ml
APS 10 %	10 µl
TEMED	2 µl

Die oben angegebenen Mengen von Acrylamid, Tris-Puffer und Wasser für das Trenn- und Sammelgel wurden getrennt angesetzt und gut durchgemischt. Anschließend wurde zuerst durch Zugabe der Radikalbildner APS und TEMED die Polymerisation im Trenngel in Gang gesetzt, das Trenngel in die Gießapparatur gefüllt und mit Methanol (100 %) überschichtet. Nach Abschluß der Polymerisation (ca. 30 Minuten) wurde der nicht polymerisierte Überstand mit dem Methanol entfernt. Das Sammelgelgemisch wurde mit APS und TEMED versetzt, gut gemischt und auf das Trenngel gegossen. Dabei wurde sofort ein Kamm mit den Platzhaltern für die Proben eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten Polymerisationszeit wurde der Kamm entfernt und das Gel mit den Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Der Elektrophoresepuffer (Laufpuffer) wurde in die Pufferkammern der Anode und der Kathode eingefüllt.

Vorbereitung der Proteinproben:

Für die SDS-PAGE wurden die durch Lyse von CD34+-Zellen aus NSB gewonnenen Proteinproben eingesetzt (siehe 2.2.7). Proben mit 40 – 60 µg Protein wurden in Eppendorfgefäßen mit 2-fach Beladungspuffer mindestens im Verhältnis 1:1 gemischt bis zu einem Endvolumen von 25 µl. Bei einem Probevolumen zwischen 13 und 23 µl wurde alternativ 5-fach Beladungspuffer verwendet. Ebenso wurden etwa 5 µl des Proteinstandards mit 5 µl 5-fach Beladungspuffer durchgemischt. Alle Proteinproben einschliesslich des Proteinmarkers wurden 5 Minuten lang im Heizblock bei 95 °C erhitzt und nach Abkühlung und Abzentrifugieren vorsichtig mit einer Pipettierhilfe in die Probentaschen überführt. Als positive Referenz für BCL-2 diente ein Lysat von Jurkatzellen mit 10 µg Protein.

Zunächst liess man bei 60 Volt Spannung die Proben aus den Taschen in das Sammelgel laufen. Danach erfolgte die Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese im Trenngel bei einer Spannung von 100 – 120 V. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte (nach 1,5 – 2,5 Stunden). Das Elektrophoresegel wurde anschliessend für Westernblot-Analysen verwendet.

2.10. Westernblot

Beim Westernblot werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel durch einen Elektrotransfer auf eine unbewegliche Nitrozellulosemembran / PVDF-Membran übertragen. Den Blot (d.h. die unbewegliche Matrix mit den transferierten Proteinen) lässt man zur Identifizierung der Proteinantigene mit den entsprechenden Antikörpern reagieren. In dieser Arbeit wurde die Westernblot-Analyse durchgeführt, um die Expression von Proteinen zu untersuchen, die an der Regulation der Hämatopoese beteiligt sind.

Nitrocellulosemembran: (Amersham, England)
Filterpapier: (Whatman GmbH, Dassel)
Transferpuffer: 20 mM Tris / 150 mM Glycin / 20 % Methanol (v/v) /
0,5 % SDS (w/v) pH 8,3
Blockierungslösung: 10 % (w/v) Milchpulver in PBS, 0.1% (w/v) Tween 20
Waschlösung: PBS, 0.1% (w/v) Tween 20

Primäre Antikörper: Maus-Anti-Mensch-Bcl-2-MoAK,
(BDBiosciences, Pharmingen)
Kaninchen-Anti-Mensch-I κ B- α -MoAK
(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
Kaninchen-Anti-Mensch-NF- κ B-MoAK
(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)
Kaninchen-Anti-Mensch-Survivin
(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)
Maus-Anti-Mensch- β -Aktin-MoAK
(Sigma, St Louis, Missouri, USA)

Sekundärer Antikörper: Ziege-Anti-Kaninchen polyklonaler Antikörper als Peroxidasekonjugat (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)

Entwicklungs-Reagenz: für Chemilumineszenz

(Supersignal West Femto, Pierce, Rockford, IL, USA)

Röntgenfilme: Kodak-Film (Amersham, England)

Der Elektrotransfer beim Western Blotting wurde mit dem Semi-Dry-Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984) durchgeführt. Dazu wurden 2 Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran auf die Trenngelgröße (Sammelgel wird abgetrennt) zugeschnitten und in Transferpuffer bzw. Methanol getränkt. Das Elektrophoresegel (2.2.8.), die nassen Filterpapiere und die Nitrozellulose-Membran wurden wie folgt zwischen Kathode und Anode angeordnet: Kathode, 1 Filterpapier, Elektrophoresegel, Nitrozellulose-Membran, 1 Filterpapier, Anode. Vor Anbringen der Kathode wurden Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten ausgepreßt. Bei einer Stromstärke von 100 mA für ein Gel oder 200 mA für 2 Gele wurden Proteine in einer Semi-Dry-Kammer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Danach wurden unspezifische kopplungsfähige Gruppen der Membran mittels 10 % Milchpulver in PBS / 0,1 % Tween 20 eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Alle weiteren Schritte erfolgten unter leichtem Schütteln auf einem Kippschüttler. Nach Verwerfen der Blockierungslösung (20 ml) wurde die Membran mit den entsprechenden primären monoklonalen Antikörpern (Anti-Survivin (1:2000); Anti-BCI-2 (1:2000); Anti-I κ B- α (1:1000); Anti-NF- κ B (1:2000) und Anti- β -Aktin (1:2000)) in 5 % Milchpulver / PBS / Tween 20 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS / Tween 20 für jeweils 10 Minuten wurde der polyklonale sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen GAR-POX 1 : 10 000) als Peroxidasekonjugat in 5 % Milchpulver / PBS / Tween 20 eingesetzt und der Blot 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach intensivem Waschen (2 x je 10 Minuten mit PBS / Tween 20 und 1 x mindestens 20 Minuten mit PBS) wurden die immunomarkierten Proteinbanden über Chemilumineszenz detektiert, d.h. mit Hilfe eines Entwicklungreagenzes nach Pierce und der Blot mit einem Röntgenfilm fotografiert.

Auf der bereits entwickelten Membran wurden weitere Proteine nach Strippen der Antigen-Antikörper-Bindungen lokalisiert. Die Membran wurde dazu 10 – 20 Minuten in Amido Black Destain inkubiert und dreimal 10 Minuten mit PBS / Tween 20 gewaschen. Anschliessend erfolgte eine neue Auswertung des Westernblots mit Blockieren, Immunomarkieren und Detektieren des neuen Proteins.

2.11. Statistische Analysen

Für statistische Berechnungen wurde SPSS 16,0 für Windows verwendet. Zum Vergleich der Markierungsansätze (Kontrollen mit unmarkierten Zellen; mit Endorem oder Resovist) kamen der nicht-parametrische Dunn's Test, der parametrische Bonferroni's Test und der parametrische Tukey-Kramer's Test zur Anwendung. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Markierungsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war.

3. Ergebnisse

3.1. *In vitro*-Effekte der Behandlung / Markierung humaner CD34+-Zellen mit MR-Kontrastmittel

Ziel dieser Arbeit war es, eine klinisch anwendbare MR-Markierungstechnik zu finden, die das Überleben und die kurz- und langfristige Differenzierungskapazität von hämatopoietischen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (CD34+-Zellen) nicht negativ beeinflusst.

Zuerst wurde die Aufnahme von zwei verschiedenen SPIO MR-Kontrastmitteln (Endorem und Resovist) durch CD34+-Zellen aus Nabelschnurblut (NSB) unter Anwendung der Eisenfärbung mittels Preussisch-Blau und der Anti-Dextran-Immunofärbung bestimmt. Die Aufnahme von Resovist und Endorem in frisch isolierten CD34+-Zellen (85 % bzw. 83 %) war höher als in aufgetauten Zellen (49 % bzw. 61 %). Jedoch reichte die Ausbeute an CD34+-Zellen aus frischem Nabelschnurblut (1-2 Spenden) für die MR-Bildgebung im Mausmodell nicht aus. Für die hier beschriebenen präklinischen Experimente zur MR-Markierung wurden alternativ kryokonservierte mononukleäre Stammzellen von durchschnittlich 10 Nabelschnurblutspenden verwendet.

3.1.1. Überleben und Apoptosegrad nach Markierung

Nach Behandlung / Markierung mit Kontrastmittel wurde primär das Überleben und die Apoptose von aufgetauten CD34+-Zellen *in vitro* analysiert. Nach Färbung mit FITC-markiertem Annexin V liess sich keine signifikante Zunahme der Apoptose in aufgetauten CD34+-Zellen nach vierstündiger Behandlung mit Lipofektin oder mit Resovist und Lipofektin gegenüber der Kontrolle (4 h serumfreie Inkubation - Lipofektin) beobachten (Abb.5).

Bei gleichzeitiger Anwendung von Propidiumiodid wurden ebenfalls keine Veränderungen in der Membranpermeabilität bzw. Vitalität der Zellen nachgewiesen weder nach alleiniger Behandlung mit Lipofektin noch nach Markierung mit Resovist und Lipofektin.

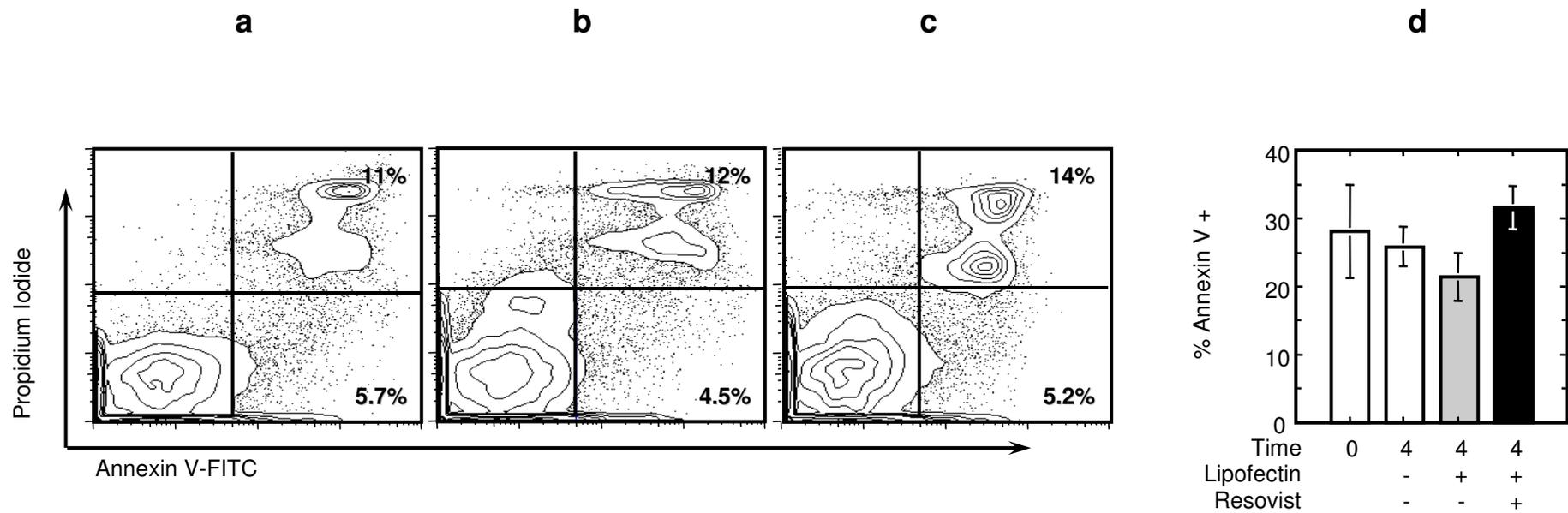


Abb.5: Apoptoserate nach Markierung mit Lipofektin und Resovist

CD34+-Zellen aus NSB wurden markiert mit Resovist-Lipofektin-Komplexen wie in 2.2.2.1. beschrieben. Nach 4 Stunden unter Standard-Kulturbedingungen wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid gefärbt. Es werden die % apoptotischen (mit Annexin V gefärbten) Zellen nach der Inkubation in Kulturmedium ohne Resovist oder Lipofektin (a), mit Lipofektin (b) oder mit Resovist und Lipofektin (c) gezeigt. In 5 Wiederholungsmessungen gab es keine Veränderungen in der Zahl apoptotischer Zellen nach irgendeiner dieser Behandlungen (Mittelwerte ± Standardabweichung, n=5) (d).

3.1.2. Wachstums- und Differenzierungspotenzial von 14-Tage-Kulturen

Anschließend wurde das Wachstums- und Differenzierungspotenzial von CD34+-Progenitorzellen in verschiedenen Markierungsansätzen verglichen. Als positive Referenz wurden aus Nabelschnurblut gewonnene aufgetaute CD34+-Zellen (Input) verwendet. Als weitere Kontrollen dienten Zellen nach vierstündiger Inkubation in serumfreiem Medium ohne oder mit Lipofektin (4 h Serumfrei und Lipo). SPIO-Kontrastmittel (Endorem und Resovist) wurden jeweils mit Lipofektin eingesetzt und die aus determinierten Vorläuferzellen (BFU-E, CFU-GEMM und CFU-GM) gebildeten Kolonien im Lichtmikroskop nach Standardkriterien ausgezählt und ausgewertet (siehe Kapitel 2.5.; Abb. 6 und 8). Es zeigte sich, dass die kurzfristige Koloniebildungskapazität aller in 14-Tage-Kulturen untersuchten CFUs durch die Markierung mit Resovist und Lipofektin im Vergleich zur Kontrolle (4h Serumfrei) nicht beeinträchtigt wurde (Tabelle 3 und Abb. 7, 9 und 10). Auch die alleinige Behandlung mit Lipofektin bewirkte keine signifikanten Veränderungen in der Koloniebildung gegenüber der Kontrolle (4 h Serumfrei) und Resovist mit Lipofektin. Zwar wurden unter dem Einfluss von Lipofektin geringe Abnahmen in der Koloniebildung von CFU-GEMM und CFU-GM beobachtet; sie erreichten aber keine statistische Signifikanz (Tabelle 3 und 4 sowie Abb. 9 und 10).

Tabelle 3: Koloniebildung nach Markierung

	Input n = 18	4 h Serum- frei n = 18	Lipo n = 4	Lipo + Endo n = 9	Lipo + Reso n = 15
BFU-E	16,00 ± 1,63	12,67 ± 0,88	14,00 ± 1,31	9,89 ± 1,61	14,37 ± 0,92
CFU-GEMM	9,56 ± 1,09	5,78 ± 0,72	4,50 ± 1,31	2,72 ± 0,72	5,87 ± 0,72
CFU-GM	14,75 ± 2,31	10,03 ± 0,94	7,13 ± 1,37	5,39 ± 1,03	9,27 ± 0,81

Die Ergebnisse werden angegeben als Zahl der Kolonien pro 100 ausplattierte Zellen; sie stellen Mittelwerte ± Standardabweichungen von mindestens 4 unabhängigen Experimenten dar.

n: Zahl der Messungen in gleichen Versuchsansätzen

Input: CD34+-Zellen aus NSB ohne Vorbehandlung

4 h Serumfrei: Zellen wurden 4 h in serumfreiem Medium gehalten (1. Kontrolle)

Lipo: Zellen nach Inkubation mit Lipofektin (2. Kontrolle)

Lipo + Endo: Zellen nach Markierung mit Endorem und Lipofektin

Lipo + Resovist: Zellen nach Markierung mit Resovist und Lipofektin

Jedoch reduzierte Endorem die Koloniebildung der CFUs signifikant gegenüber den Kontrollen und Resovist. Im Einzelnen war die Koloniebildung von BFU-E nach Markierung mit Endorem und Lipofektin signifikant reduziert gegenüber derjenigen nach Markierung mit Resovist und Lipofektin ($p = 0,021$) (siehe Tabelle 4 und Abb. 7). Das gleiche Ergebnis liess sich auch für die Koloniebildung von CFU-GEMM und CFU-GM zeigen ($p = 0,011$ bzw. $0,010$) (siehe Tabelle 4 und Abb. 9 und 10). Zusätzlich wurde in diesen Tests nach Markierung mit Endorem und Lipofektin auch eine signifikante Abnahme der Koloniebildung gegenüber Kontrollbedingungen (4 h Serumfrei) nachgewiesen ($p = 0,016$ bzw. $0,007$).

Insgesamt erwies sich Resovist als das effektivere MR-Kontrastmittel. Deshalb wurde für die nachfolgenden Experimente Resovist verwendet.

Tabelle 4: Statistische Auswertung mittels Students-T-Test

BFU-E	Markierungsansätze			P-Werte		
	Lipofektin	Endorem	Resovist	Serumfrei vs	Lipo vs	Endo vs
	+	-	-	0,525	1,0	-
	+	+	-	0,126	0,169	1,0
	+	-	+	0,207	0,858	0,021
CFU-GEMM	Lipofektin	Endorem	Resovist	Serumfrei vs	Lipo vs	Endo vs
	+	-	-	0,468	1,0	-
	+	+	-	0,016	0,264	1,0
	+	-	+	0,934	0,414	0,011
CFU-GM	Lipofektin	Endorem	Resovist	Serumfrei vs	Lipo vs	Endo vs
	+	-	-	0,202	1,0	-
	+	+	-	0,007	0,394	1,0
	+	-	+	0,565	0,254	0,010

Die verschiedenen Markierungsansätze (siehe Tabelle 3) wurden unter Anwendung des gepaarten Students-T-Test miteinander verglichen. Die P-Werte in der Spalte unter Serumfrei vs entsprechen den Vergleichen zwischen:

- Serumfrei vs Lipofektin,
- Serumfrei vs Endorem + Lipofektin
- Serumfrei vs Resovist + Lipofektin usw.

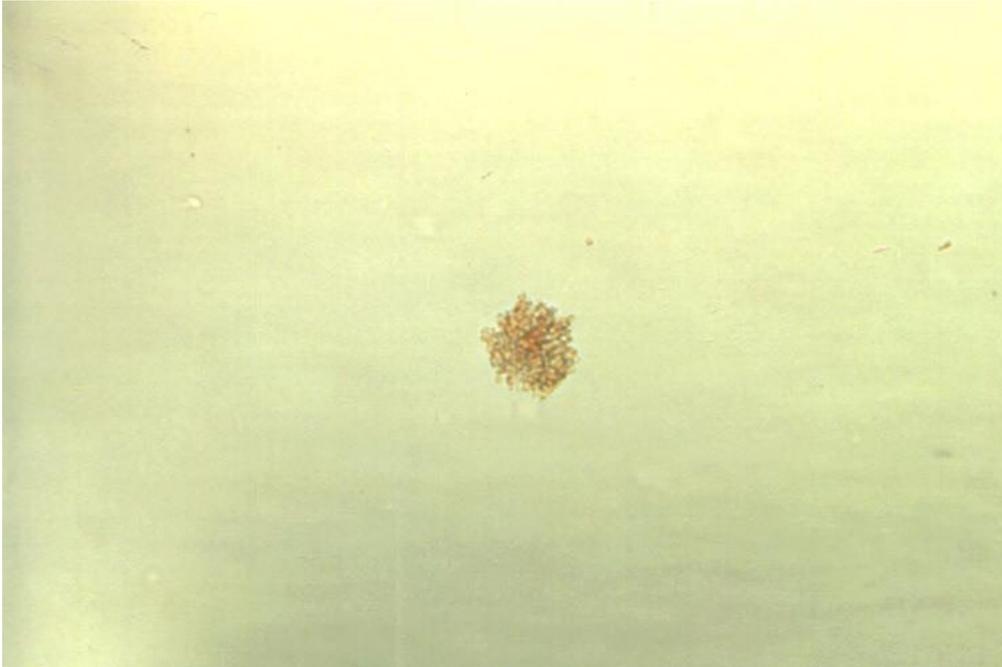


Abb.6: Koloniebildung von normalen BFU-E aus 14 Tage-Kulturen von Nabelschnurblut in Methylzellulose-Medium
(nach Oostendorp, 2005).

Mit Hilfe der Methylzellulose-Technik lassen sich Kolonien relativ schnell im Lichtmikroskop ablesen und über die Farbe der Clusterbildung unterscheiden. Die Kolonien von BFU-E erscheinen typisch dunkelrot-braun, weil während der Kulturperiode Hämoglobin unter dem Einfluss von Erythropoietin synthetisiert wird.

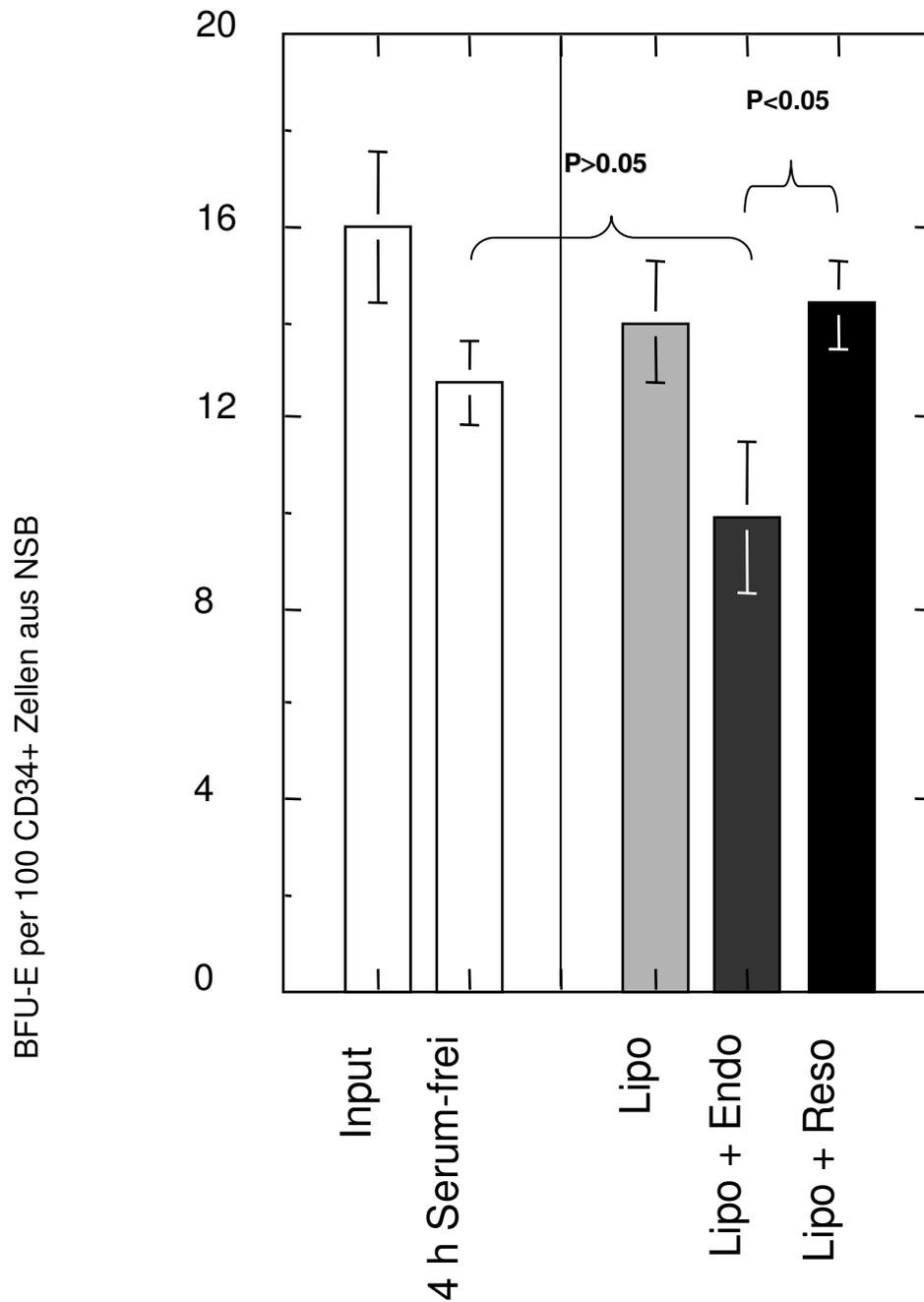


Abb.7: Effekt der Markierung mit Resovist auf BFU-E-Kolonien

Die Bildung von BFU-E-Kolonien von aufgetauten humanen CD34+-Zellen aus NSB (INPUT) wurde in Kontrollen und nach Markierung mit Resovist und Lipofektin unter gleichen Bedingungen analysiert wie in der Legende zu Tabelle 3 beschrieben.

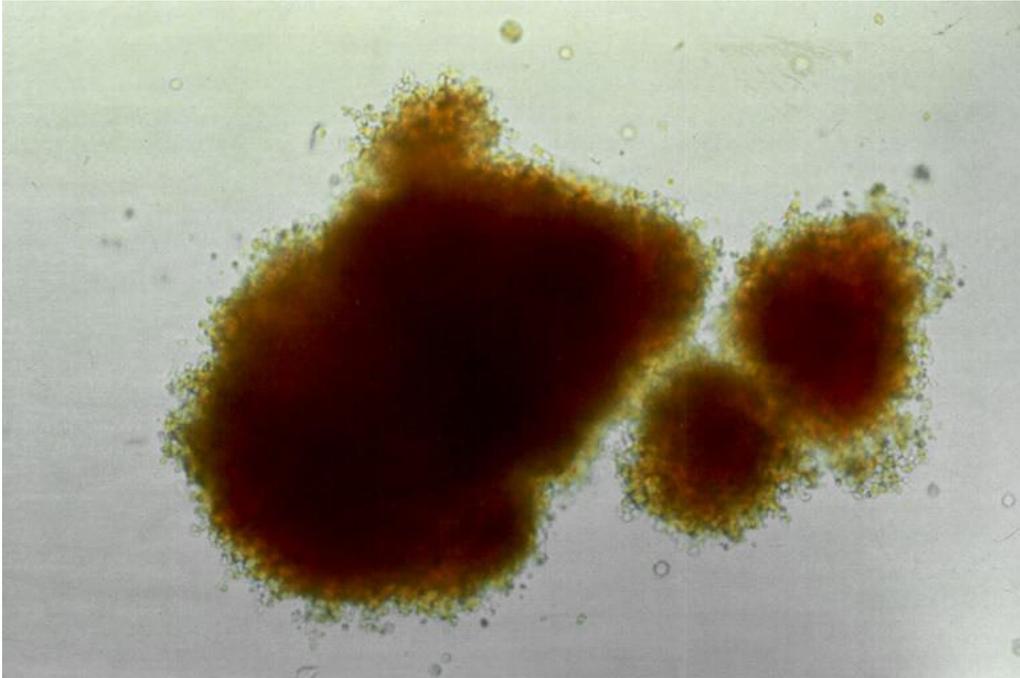


Abb.8: Koloniebildung von normalen CFU-GEMM aus 14 Tage-Kulturen von Nabelschnurblut in Methylzellulose-Medium
(nach Oostendorp, 2005)

Kolonien von CFU-GEMM enthalten Zellen aller hämatopoietischen Linien und bilden die grössten Cluster überhaupt.

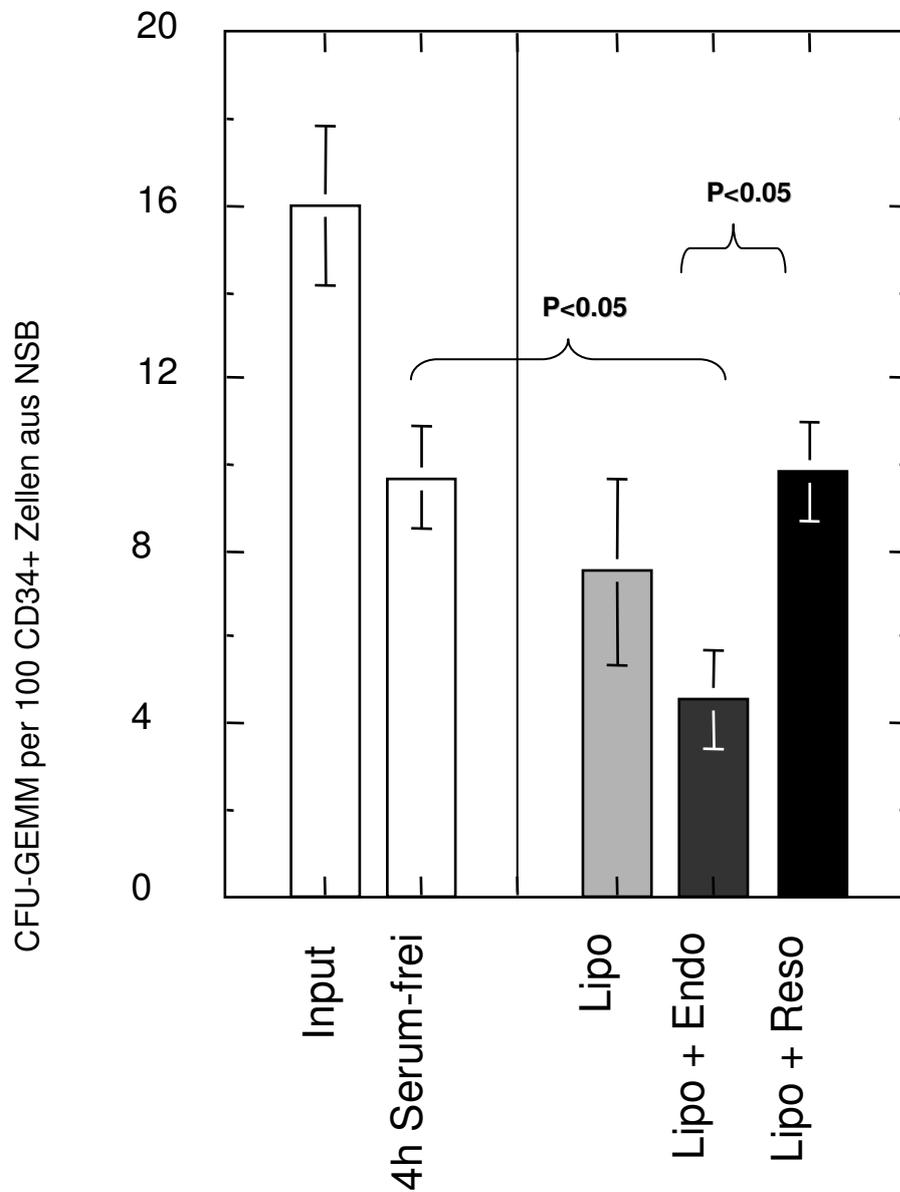


Abb.9: Effekt der Markierung mit Resovist auf CFU-GEMM-Kolonien vergleiche Abb.7

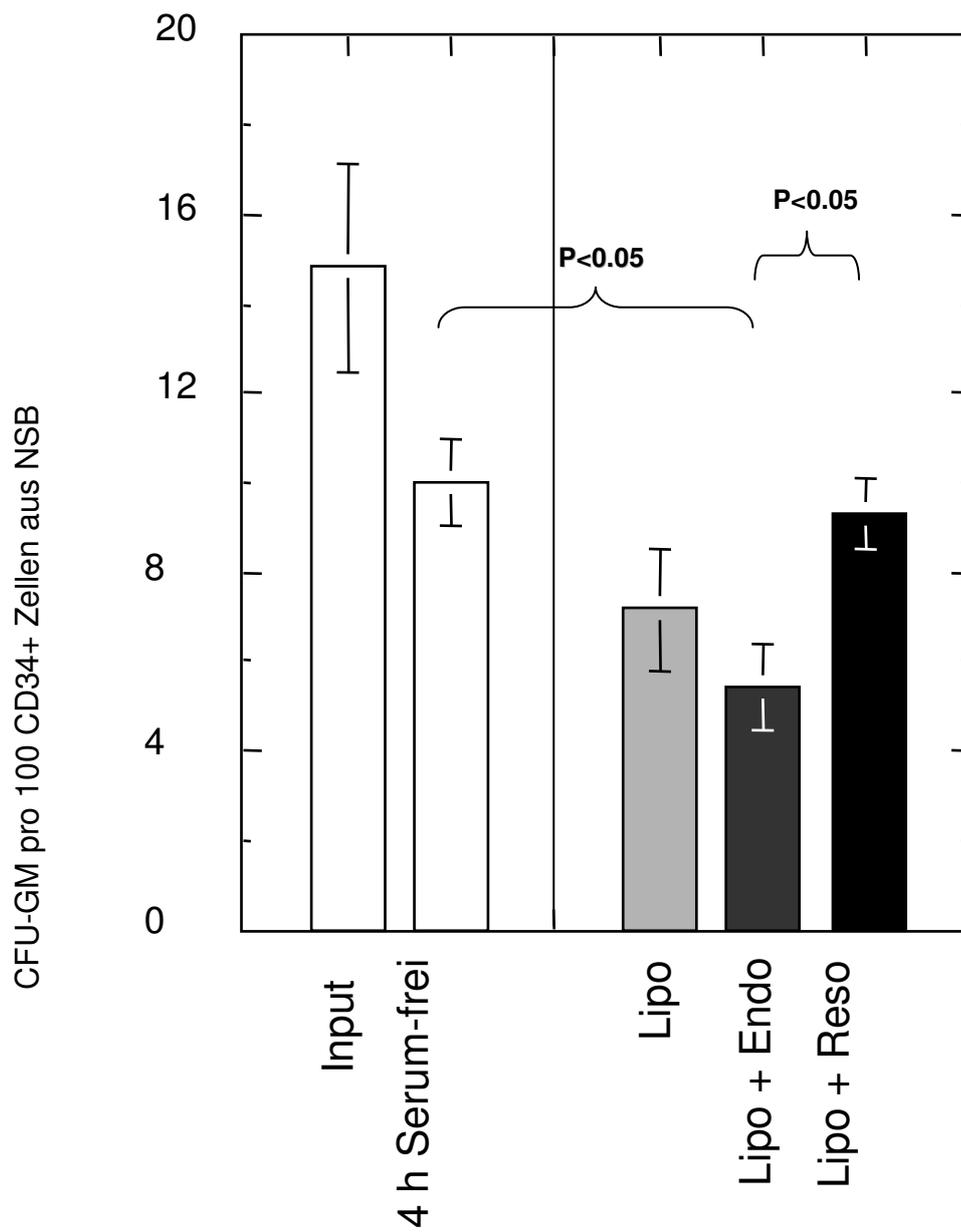


Abb.10: Effekt der Markierung mit Resovist auf CFU-GM-Kolonien
siehe Abb.7

3.1.3 Wachstumspotenzial von Langzeitkulturen

Vorläuferzellen sind Nachkommen von Stammzellen. Wenn Vorläuferzellen nach etwa 3 Wochen keine Kolonien mehr bilden können, bilden Stammzellen immer wieder Vorläuferzellen nach. Das bedeutet, je später man die Zahl der Vorläuferzellen in Kulturen bestimmt, um so eher kann man sich dem Potenzial der Stammzellen annähern. Vorläuferzellen werden zu einem frühen Zeitpunkt (nach 2 Wochen) bestimmt. In Langzeitkulturen (nach 6, 8, 10 und 12 Wochen) kann man zudem die Frequenz von kopfsteinpflasterbildenden Kolonien (CAFC) pro 100 ausplattierte Zellen feststellen. Dabei nähert sich die Aktivität der Kulturen nach 12 Wochen dem Potenzial der Stammzellen am ehesten an. Solche Langzeitkulturen wurden in dieser Studie untersucht (siehe Abb.11), um festzustellen, ob auch die Zellen, deren Aktivität mit Stammzellen am ehesten vergleichbar ist, von der Markierungsmethode beeinflusst werden. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen von CAFC nach der Markierung mit Resovist und Lipofektin gegenüber der unmarkierten Kontrolle (4h Inkubation in serumfreiem Medium) (Abb. 12). Lipofektin alleine oder Endorem und Lipofektin reduzierten die CAFC-Bildung nicht signifikant (nicht dokumentierte Resultate).



Abb.11: CAFC von humanen CD34+-Zellen
(nach Oostendorp, 2005)

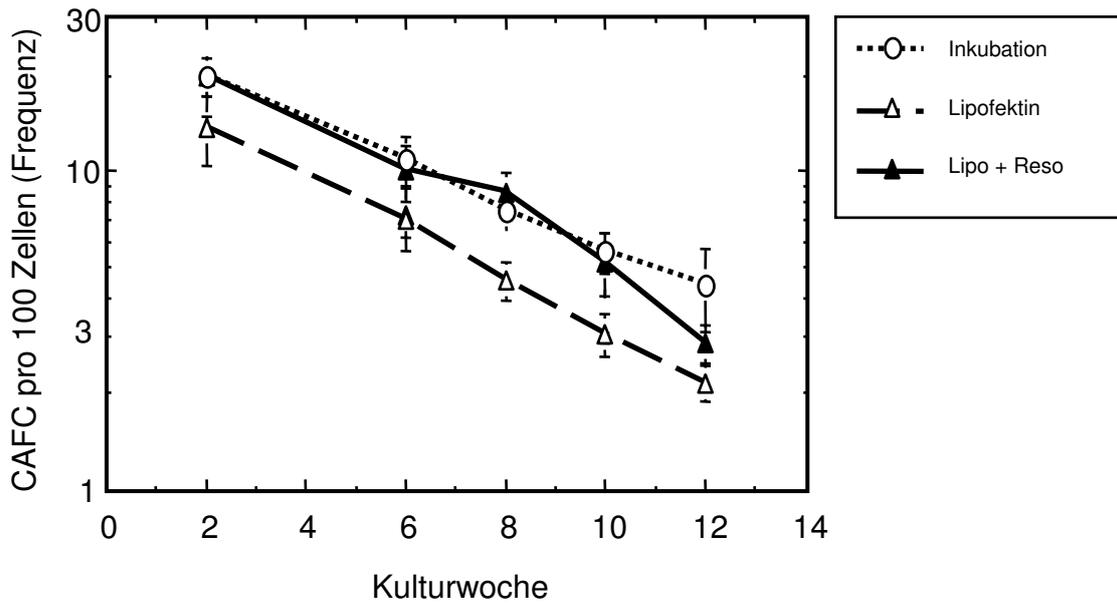


Abb. 12: Frequenz von frühen und späten CAFC von humanen CD34+-Zellen

Aufgetaute aus NSB stammende CD34+-Zellen wurden mit serumfreiem Medium inkubiert (○, Inkubation), mit Lipofektin (△, Lipo) oder mit Lipofektin und Resovist (▲, Lipo + Reso) behandelt und in einem CAFC-Test mit 20 Wiederholungen pro Verdünnung analysiert. Kopfsteinpflasterartige Kolonien wurden früh (nach 2 Wochen) und spät (nach 6, 8, 10 und 12 Wochen) gezählt und die CACF-Frequenz mittels der L-Calc-Software (Stem Cell Technologies) ermittelt. Die Messdaten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung der CAFC pro 100 ausplattierte Zellen angegeben.

3.1.4. Expression regulatorischer Proteine nach Markierung

Die Zahl hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen wird u.a. durch die Apoptose oder den programmierten Zelltod reguliert (Kondo et al., 2003). Einzelnen Proteinen wird eine wichtige Rolle in der Regulation des Überlebens von HSZ zugeschrieben, wie NF κ B, I κ B, BCL-2 und Survivin (Pyatt et al., 1999, Domen et al., 2001 und Fukuda et al., 2001). Da diese Überlebenssignale von CD34+-Progenitorzellen durch die Markierungsmethode stimuliert und auf diese Weise die Funktion von Stammzellen beeinflusst werden könnten, haben wir die Expression von NF κ B, I κ B, BCL-2 und Survivin in CD34+-Zellen von Nabelschnurblut nach verschiedenen Behandlungen im Westernblot untersucht. Wie auch viele andere Arbeitsgruppen haben wir β -Aktin als internen Referenzmarker verwendet, d.h. die Expression von β -Aktin als Maß für die Zahl der Zellen im Proteingemisch betrachtet. Die Nutzung eines solchen „house-keeping“ Proteins basiert auf der Annahme, dass seine Proteinexpression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen unverändert bleibt.

Abb. 13 A-C zeigt repräsentative Beispiele von Westernblots für NF- κ B und I κ B- α sowie für das „housekeeping“ Protein β -Aktin. NF- κ B und I κ B- α liessen sich in CD34+-Progenitorzellen aus aufgetautem Nabelschnurblut klar nachweisen. Es zeigten sich keine erkennbaren Unterschiede in der Expression dieser Proteine gegenüber dem internen Referenzmarker β -Aktin weder nach Markierung mit Resovist und Lipofektin noch nach alleiniger Behandlung mit Lipofektin.

Dagegen konnten BCL-2 und Survivin in CD34+-Zellen aus NSB in der vorliegenden Untersuchung nicht detektiert und bewertet werden. Jedoch gelang der Nachweis dieser Proteine in Jurkat-Zellen (Leukämiezelllinie von humanen hämatopoietischen T-Zellen) (nicht dokumentiertes Ergebnis).

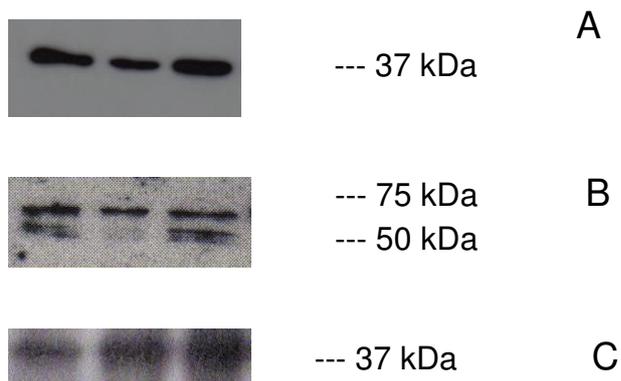


Abb. 13 A-C: Westernblots von CD34⁺-Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut

Die Proben stellen Lysate von $5 - 10 \times 10^6$ CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut mit 40 – 60 µg Protein pro Gelbande dar. Die Zelllysate wurden geblottet, mit spezifischen Antikörpern markiert, wie im Methodenteil beschrieben, und die Proteine mittels Chemilumineszenz auf Kodakfilmen detektiert.

Abb. 13 A zeigt β-Aktin (42 kDa), Abb. 13 B zwei Banden des Proteins NF-κB (50 kDa und 65 kDa) und Abb. 13 C IκB-α (41 kDa). Die Banden auf dem Blot zeigen von links nach rechts jeweils die Kontrolle (4 h serumfreie Inkubation - Lipofektin), Markierung mit Resovist und Lipofektin und alleinige Behandlung mit Lipofektin.

4. Diskussion

Die Effizienz einer Stammzelltherapie hängt ab vom Homing-Verhalten, dem Anwachsen und der Proliferation transplantierte Stammzellen im Knochenmark. Das Homing von hämatopoietischen Vorläuferzellen wird als ein Prozess aus vielen verschiedenen miteinander koordinierten Schritten betrachtet. Dazu gehören die Adhäsion an Endothelzellen sinusoidaler Gefäße, die transendotheliale Wanderung und die Verankerung in Knochenmarknischen, wo eine dauerhafte Rekonstitution der Hämatopoese und linienspezifische Differenzierungen stattfinden (Voermans et al., 2001; Chute, 2006; Chavakis et al., 2008).

Nabelschnurblut von Neugeborenen zeigt als Stammzellquelle einige Vorteile gegenüber Stammzellen von Erwachsenen aus Knochenmark und peripherem Blut:

1. Es toleriert eine höhere HLA-Disparität des Empfängerbluts bei der allogenen Stammzelltransplantation (Bradley et al., 2005).
2. Es besitzt einen höheren Anteil primitiver Vorläuferzellen mit höherem Wachstumspotenzial (Grewal et al., 2003; Mayani et al., 1998; Gluckman et al., 1997).
3. Im Xenotransplantationsmodell subletal bestrahlter NOD/SCID-Mäuse zeigen CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut ein höheres Rekonstitutionspotenzial (Wang et al., 1997; Conneally et al., 1997; Noort et al., 1998).

Wegen der geringen Menge an Nabelschnurrestblut und der dadurch begrenzten Gesamt-Zellzahl stellte sich die Frage, ob man intravenös injizierte humane hämatopoietische Vorläuferzellen lokalisieren und während ihrer Wanderung zum Knochenmark in immundefizienten Mäusen mittels der MR-Bildgebung verfolgen kann.

Wenn man das Schicksal markierter Zellen im Mausmodell *in vivo* im zeitlichen Verlauf sichtbar machen kann, sollten dadurch auch Einblicke in das Homing-Verhalten möglich sein und der Erfolg einer Stammzelltherapie beurteilt und eventuell vorhergesagt werden können. Deshalb war das Ziel der vorliegenden präklinischen Untersuchungen, eine effiziente, klinisch anwendbare MR-Markierungstechnik für Zellen aus Nabelschnurblut zu finden.

Neu in dieser Arbeit gegenüber früheren Studien (z. B. Daldrup-Link et al., 2005a) war, dass wir uns vor allem auf die schwer zu markierende CD34+-Subpopulation konzentriert haben, weil diese Zellpopulation frühe und späte Vorläuferzellen enthält (Bonde et al., 2004). Eine Markierung dieser CD34+-Zellen und die *In-Vivo*-Visualisierung ihrer Wanderung im MRT nach Transplantation in athyme Mäuse wurde bisher nicht publiziert.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Markierung mit Resovist und Lipofektin die Vitalität und die hämatopoietischen Funktionen von humanen CD34+-Progenitorzellen aus Nabelschnurblut *in vitro* nicht beeinträchtigt. Mit Hilfe dieser effizienten Markierungstechnik gelang es zudem in einer nachfolgenden Studie, die Wanderung markierter CD34+-Vorläuferzellen zum Knochenmark (Homing-Verhalten) in immundefizienten Nacktmäusen (Balb/c-AnN Foxn1^{nu}/Crl) nach intravenöser Injektion von 1×10^7 Zellen mittels klinischer 1,5 T MR-Bildgebung nicht invasiv zu detektieren und zu evaluieren. Teile dieser Arbeit wurden inzwischen veröffentlicht (siehe Anhang 7.2.: Niemeyer et al., 2010).

4.1. Allgemeine Aspekte zu klinisch anwendbaren MR-Markierungstechniken

Einige Arbeitsgruppen haben bereits Markierungstechniken mit verschiedenen MR-Kontrastmitteln und Transfektionsagenzien für präklinische *In-Vivo*-Studien zur Wanderung transplanteder Stammzellen entwickelt (Daldrop-Link et al., 2003; Frank et al., 2003; Arbab et al., 2005; Rudelius et 2003). Die nicht invasive MRT-Bildgebung erlaubt es, das spezifische Homing-Verhalten nach einer Stammzelltransplantation auch im Menschen zu untersuchen, z.B. in Bezug auf die benötigte Zellzahl und die optimale Applikationsmethode. Für die klinische Anwendung muss eine Markierungsmethode bestimmte Kriterien erfüllen:

- Vorzugsweise sollte ein klinisch zugelassenes MR-Kontrastmittel und Transfektionsagenz angewendet werden.
- Die markierten Zellen sollten mit Hilfe eines klinischen 1,5 Tesla MR-Scanners detektierbar sein.
- Die Methode sollte leicht anzuwenden sein und nicht invasiv.
- Das MR-Kontrastmittel sollte hohe Relaxationsraten aufweisen.
- Die Methode sollte zu hoch effizienter zellulärer Aufnahme des Kontrastmittels führen ohne Veränderungen der Zelloberfläche.
- Die zelluläre Markierung sollte höchstens mit geringer Zytotoxizität verbunden sein. Normales Wachstum und die Differenzierung der Stammzellen sollten dadurch nicht beeinträchtigt werden (Rudelius et al., 2003).

Als MR-Kontrastmittel zur *in vivo* Visualisierung der Wanderung repopulierender Stammzellen im Mausmodell werden heute klinisch zugelassene SPIOs (superparamagnetic iron oxide particles) (z.B. Feridex oder Endorem und Resovist) wegen der folgenden Eigenschaften bevorzugt eingesetzt:

- Sie bewirken die größte MR-Signaländerung pro Metalleinheit insbesondere auf T2^{*}-gewichteten MR-Bildern.
- Ihr Eisenanteil wird in den normalen Eisenstoffwechsel der Zielzellen aufgenommen und wiederverwertet.
- An ihre Dextranhülle können funktionelle Gruppen (Transfektionsagenzien) gebunden werden.
- Sie können im Licht- und Elektronenmikroskop leicht detektiert werden (Syková et al., 2009)

Humane Stammzellen und nicht phagozytierende oder sich langsam teilende CD34⁺-Vorläuferzellen können von Dextran umhüllte SPIOs nur unzureichend aufnehmen wegen der negativen Oberflächenladung der SPIOs (Daldrup-Link et al., 2003 und 2005a; Maxwell et al., 2008).

Die geringe Eisenaufnahme in CD34⁺-Zellen kann auch damit erklärt werden, dass diese Zellen den Transferrin-Rezeptor (CD71) nicht exprimieren, der einen Teil der Eisenaufnahme vermittelt (Knaän-Shanzer et al., 2008). Weiterhin nehmen Progenitorzellen aus Nabelschnurblut deutlich mehr SPIOs auf als Vorläuferzellen aus peripherem Blut (Daldrup-Link et al., 2005b). Da die Eisenaufnahme in engem Zusammenhang zum Energiehaushalt und damit zur Proliferation steht, kann man den letzten Befund darauf zurückführen, dass Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut eine höhere metabolische Aktivität aufweisen (Grewal et al., 2003) und damit mehr Transferrin-Rezeptoren (CD71) exprimieren als diejenigen aus peripherem Blut.

Wegen der insgesamt unzureichenden Aufnahme von SPIOs in hämatopoetische Vorläuferzellen, wurde das Markierungsprotokoll dieser Studie durch Verwendung des lipidmodifizierenden Transfektionsagenzes Lipofektin optimiert. Lipofektin bildet über elektrostatische Kräfte Komplexe mit SPIOs, welche an die Zellmembran binden und über Pinozytose oder Endozytose in die Zellen aufgenommen werden und zu einer effizienteren Markierung führen (Daldrup-Link et al., 2003). Es ist wichtig, jede Kombination von Kontrastmittel und Transfektionsagenz (TA) für verschiedene Zellen getrennt zu untersuchen und ein optimales Konzentrationsverhältnis von SPIO zu TA zu finden, wo sich stabile Komplexe bilden, die Aufnahme von SPIO in die Zellen begünstigt wird und TA auf die Zellen nicht toxisch wirkt (Kalish et al., 2003). Niedrigere Konzentrationen des Transfektionsagenzes können zu einer unzureichenden zellulären Aufnahme führen, während höhere Konzentrationen die Präzipitation der Komplexe induzieren oder für die Zellen toxisch sein können.

Für bestimmte Zwecke kann es vorteilhaft sein, hämatopoetische Zellen mit klinisch zugelassenen Gadolinium (Gd)-Chelaten zu markieren, z.B. für humane Monozyten zur Analyse von Entzündungsprozessen, weil diese Zellen Gd-Chelate spontan über Phagozytose aufnehmen, obwohl mit diesen MR-Kontrastmitteln eine viel geringere Sensitivität der Zelldetektion als mit SPIOs erreicht wird (Daldrup-Link et al., 2009). SPIOs reduzieren zudem das MR-Signal auf T2-gewichteten MR-Bildern, während paramagnetische Gadolinium-Chelate eine Signalerhöhung der T1-Relaxation bewirken (Syková et al., 2009). Beispiele für effiziente Markierungsmethoden mit Gd-Chelaten werden später in Kapitel 4.3. beschrieben.

4.2. Vergleich der *In-Vitro*-Resultate mit anderen Markierungstechniken

In der vorliegenden Studie wurden aus aufgetautem Nabelschnurblut stammende CD34+-Vorläuferzellen durch das SPIO-Kontrastmittel Resovist und Lipofektin unter einfachen Kulturbedingungen *in vitro* effektiv markiert.

Weder durch die alleinige Behandlung mit Lipofektin noch durch die Markierung mit Resovist und Lipofektin wurde die Vitalität und der Apoptosegrad von CD34+-Zellen signifikant beeinträchtigt (Abb.5). Außerdem wurden unter diesen Bedingungen keine signifikanten Veränderungen des kurz- und langfristigen Differenzierungspotenzials der Zellen (BFU-E, CFU-GM und CFU-GEMM sowie CAFC) *in vitro* beobachtet (Tabelle 3; 4 und Abb. 7, 9, 10 und 12). Im Einzelnen wurde zwar nach alleiniger Behandlung mit Lipofektin eine geringfügige Abnahme der Koloniebildung von CFU-GEMM und CFU-GM festgestellt; diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Das weist daraufhin, dass der negative Einfluss von Lipofektin auf das Differenzierungspotenzial durch Komplexbildung mit Resovist wieder kompensiert werden könnte.

Die Wirkung von Endorem mit Lipofektin unterschied sich davon deutlich. In Gegenwart von Endorem und Lipofektin wurde die kurzfristige Koloniebildung von CD34+-Vorläuferzellen gegenüber unmarkierten Zellen signifikant reduziert (Tabelle 4 und Abb. 7, 9, 10). Resovist erwies sich als das bessere MR-Kontrastmittel, das die oben aufgeführten Kriterien für die klinische Anwendung weitgehend erfüllt (siehe Kapitel 4.1.).

Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurde in früheren Markierungs- und Transplantationsexperimenten die gesamte Population mononukleärer Stammzellen aus Nabelschnurblut eingesetzt (Daldrup-Link et al., 2005a). Da diese Zellpopulation Monozyten enthält, die zur Phagozytose von SPIO befähigt sind (Metz et al., 2004), kann das gemessene MR-Signal die Fraktion der relevanten CD34+-Zellen nicht richtig widerspiegeln. Da zudem CD34+-Zellen nur einen winzigen Teil der mononukleären Zellpopulation darstellen (1 – 3 %), können Veränderungen der MR-Signalintensität durch markierte mononukleäre Zellen nicht absolut mit Zellen korreliert werden, die zur langfristigen Rekonstitution des hämatopoetischen Systems befähigt sind.

Daran wird klar, warum neue MR-Markierungstechniken immer für spezifische Stammzelltypen gesucht wurden, um z.B. das Homing von mesenchymalen Stammzellen in geschädigtem Myokard (Kraitchman et al., 2003) oder von neurologischen Stammzellen in verletztem Hirngewebe (Syková et al., 2006) zu untersuchen. Ausserdem können verschiedene hämatopoietische Zellpopulationen Unterschiede im Homing-Verhalten zeigen.

Mehrere Arbeitsgruppen entwickelten effektive Markierungstechniken durch Kombination von SPIOs mit anderen polykationischen Transfektionsagenzien, wie Poly-L-Lysin (PLL) (Arbab et al., 2003; Frank et al., 2003) oder dem klinisch zugelassenen Protaminsulfat (Arbab et al., 2004 und 2005; Maxwell et al., 2008). Die Markierung mit SPIO-PLL-Komplexen wurde nur in humanen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen untersucht, wo sich keine kurz- oder langfristigen negativen Effekte auf die Lebensfähigkeit und das Wachstum nachweisen liessen und die Apoptoserate unverändert blieb (Arbab et al., 2003 und Frank et al., 2003). Studien mit humanen hämatopoetischen CD34+-Vorläuferzellen aus peripherem Blut haben nach Markierung mit SPIO-Protaminsulfat-Komplexen keine Veränderungen in Lebensfähigkeit und Wachstum (gemessen im MTT-Test und durch Trypanblauausschluss) sowie im Hinblick auf die Apoptoserate und die Expression phänotypischer Oberflächenmarker (CD34, CD31, CXCR4, CD20, CD3 und CD14) gezeigt (Arbab et al., 2004 und 2005). Gleichzeitig gab es anhand von CFU-Tests und morphologischen Untersuchungen keine Hinweise für markierungsbedingte Veränderungen der Differenzierungskapazität (Arbab et al., 2005). Ähnliche Resultate wurden nach Markierung mit SPIO-Protaminsulfat-Komplexen auch in mesenchymalen Stammzellen gefunden (Arbab et al., 2004 und 2005).

Insgesamt wurden die Zytotoxizität und negative Einflüsse von MR-Markierungstechniken mit SPIOs und verschiedenen Transfektionsagenzien überwiegend an humanen mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen untersucht (Arbab et al., 2003; Frank et al., 2003).

Es gibt auch einige Studien mit humanen hämatopoietischen CD34+-Vorläuferzellen aus peripherem Blut (Arbab et al., 2004 und 2005; Hinds et al., 2003). Jedoch haben neben unserer Arbeitsgruppe nur Maxwell und Mitarbeiter (2008) humane hämatopoietische CD34+-Progenitorzellen aus Nabelschnurblut untersucht und gründliche funktionelle Messungen nach einer MR-Markierung durchgeführt, d.h. das Differenzierungspotenzial über die Koloniebildung von BFU-E-, CFU-GEMM- und CFU-GM-Vorläuferzellen in 14 Tage-Kulturen in Methylzellulose-Medium bestimmt. Im Unterschied zu der hier beschriebenen Methode hat die Arbeitsgruppe um Maxwell aber Protaminsulfat als Transfektionsagenz verwendet, das als Antidot für die Heparinantikoagulation klinisch zugelassen ist (Bull et al., 1975). Zusätzlich wurden Wachstumsfaktoren (Thrombopoietin, SCF und Flt-3-Ligand) eingesetzt, obwohl es Hinweise gibt, dass das Kultivieren von Zellen mit Zytokinen ihr Homing-Verhalten verändert (Ahmed et al., 2004). Das vorliegende Markierungsprotokoll ist dagegen sehr einfach und minimal invasiv, wodurch die Möglichkeit, das Homing-Verhalten der hämatopoietischen Vorläuferzellen zu verändern, minimiert wird. Damit wird ein weiteres Kriterium für die klinische Anwendung erfüllt (siehe Kapitel 4.1.).

4.3. Diskussion der *In-Vivo*-Resultate

Durch Markierung mit Resovist und Lipofektin gelang es in einer Folgestudie (siehe Anhang 7.2.), die Wanderung und das Homing-Verhalten von humanen Progenitorzellen (CD34+-Zellen) aus Nabelschnurblut nach intravenöser Injektion von 1×10^7 Zellen in athymen Mäusen *in vivo* mittels klinischer MR-Bildgebung zu messen (Niemeyer et al., 2010). Die MRT ist trotz relativ niedriger Sensitivität bezüglich der Zelldetektion anderen bildgebenden Verfahren, wie PET und SPECT, im Hinblick auf die räumliche Auflösung deutlich überlegen (Gillies, 2002). So erlaubt die MRT die Darstellung von Zellen mit hoher anatomischer Auflösung und sehr gutem Weichteilkontrast (Barkhausen et al., 2001 und Choi et al., 1997).

Andererseits kann das Markierungsprotokoll dieser Studie noch weiter optimiert werden. In neuen Studien könnte z.B. eine höhere Sensitivität der MRT durch Erhöhung des Magnetfeldes auf 9,4 Tesla erreicht werden. Alternativ könnte das Detektionslimit von 1×10^7 Zellen durch lokale Transplantation der markierten Zellen reduziert werden, zumal ein Teil der transplantierten CD34+-Zellen auch in Leber und Milz wandern und für das Homing im Knochenmark verloren gehen (Daldrup-Link et al., 2005a). Eine neue Studie hat gezeigt, dass das Potenzial zur hämatopoietischen Rekonstitution durch lokale Transplantation von CD34+Zellen aus Nabelschnurblut in das Tibia-Knochenmark von NOD-SCID-Mäusen verbessert werden kann. Die Koloniebildung war 8 Wochen nach lokaler Transplantation signifikant höher als nach intravenöser Implantation in die Schwanzvene (Meng et al., 2009). Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass eine Transplantation der Stammzellen direkt in das Knochenmark effizienter ist. Schliesslich sollte in einer weiterführenden Studie der Eisengehalt der markierten Zellen bestimmt werden, um die vorliegenden Daten mit anderen Markierungsmethoden vergleichen zu können.

Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb die hoch effiziente Markierung (83 %) von embryonalen und neuronalen Stammzellen mit Gd-DTPA (Gadolinium-Diäthylen-Triamin-Pentaacetat / Lipofektin / Calciumphosphat) (Rudelius et al., 2003). Die Markierung schien keinen Einfluss auf die Wachstums- und Differenzierungskapazität zu haben. Das Detektionslimit für die MR-Bildgebung lag bei 5×10^4 Zellen. Dabei ist zu beachten, dass die Effizienz der Markierung von anderen Stammzelltypen davon stark abweichen kann.

Darüber hinaus werden neue Markierungstechniken beschrieben, die zur Verbesserung der *In-Vivo*-Resultate beitragen können. Untersuchungen zur Markierung mit dem bifunktionellen Gadophrin-2 (einem paramagnetischen und fluoreszierenden Metalloporphyrin) und der Transfektion mit kationischen Liposomen führten zu interessanten viel versprechenden Ergebnissen (Daldrup-Link et al., 2004).

Die Markierung mit Gadophrin-2 und Liposomen ermöglichte es, die *in vivo* Verteilung von transplantierten hämatopoietischen Stammzellen in athymen Nacktmäusen gleichzeitig mit verschiedenen bildgebenden Techniken zu detektieren und die Vorteile dieser Methoden miteinander zu kombinieren. Die MRT lieferte dreidimensionale Daten. Dadurch gelang die genaue Lokalisation transplantierte Zellen in tiefem Gewebe mit einem Detektionslimit von 1×10^7 Zellen (Daldrup-Link et al., 2004). Diese *in vivo* MRT-Befunde liessen sich durch fluoreszenzmikroskopische Daten von Biopsieproben oder postmortem-Proben operativ entfernter Organe untermauern.

Maxwell und Mitarbeiter (2008) markierten CD34+-Zellen aus Nabelschnurblut mit Protaminsulfat und SPIOs, deren Dextranhülle kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Dadurch war es möglich, die markierten Zellen vor der Transplantation mittels FACS zu reinigen und MR-Hintergrundsignale durch nicht aufgenommene SPIO-Verunreinigungen zu eliminieren. Weiterhin konnten markierte CD34+-Zellen in Empfängerknochen immundefizienter Mäuse post mortem flowzytometrisch gemessen werden. Jedoch versagte die MR-Bildgebung in lebenden Mäusen bei einer Zelldosis von 4×10^5 transplantierten Zellen.

Insgesamt zeigt sich also, dass verschiedene bildgebende Verfahren, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen, komplementäre Daten zur Wanderung und zum Homing von hämatopoietischen Stammzellen liefern und so zur Verbesserung der *In-Vivo*-Resultate beitragen können. Die Kombination eines MR-Kontrastmittels mit einem Fluoreszenzfarbstoff analog zu früheren Studien ermöglicht es z.B., die Zahl der Zellen, die nach der Transplantation im Knochenmark anwachsen, mit Hilfe der Flowzytometrie quantitativ zu bestimmen. Dadurch könnte die für eine Stammzelltherapie benötigte Zellzahl korrigiert werden. Gleichzeitig könnten diese Zellen in Bezug auf ihren Phänotyp charakterisiert werden.

Das bedeutet, man könnte über die Expression typischer Oberflächenmarker Rückschlüsse ziehen, ob eher frühe oder späte CD34+-Subpopulationen an Homing und Rekonstitution der Hämatopoese beteiligt sind. Durch Anreicherung und Verwendung dieser besonderen Subpopulation könnte die Effizienz zukünftiger Therapien noch gesteigert werden.

4.4. Einfluss der Markierungstechnik auf das Überleben hämatopoietischer Stammzellen

Am Schluß sollte die Frage geklärt werden, ob die Markierung von CD34+-Zellen das Überleben funktioneller HSZ beeinträchtigt. Da einige Proteine in der Regulation des Überlebens von HSZ eine wichtige Rolle spielen können, wie NF κ B, I κ B, BCL-2 und Survivin (Pyatt et al., 1999, Domen et al., 2001 und Fukuda et al., 2001), wurde die Expression dieser Moleküle nach verschiedenen Behandlungen im Westernblot untersucht und mit der Expression des „housekeeping“ Proteins β -Aktin verglichen.

β -Aktin kommt als eines von 6 Isoformen des zytoskeletalen Proteins nur in Nichtmuskelzellen vor (Vandekerckhove et al, 1978). Seine Funktion als zuverlässiger interner Referenzmarker zur Normalisierung von Gen- und Proteinexpression wird durch verschiedene Studien belegt.

Dieses „housekeeping“ Protein zeigt z.B. in humanem Lebergewebe, Prostata-tumoren und mononukleären Zellen aus peripherem Blut unter verschiedenen experimentellen Bedingungen eine konstante Gen- und Proteinexpression (Sun et al., 2009; Mori et al., 2008; Sudchada et al., 2010). β -Aktin erwies sich auch in dieser Untersuchung als geeigneter Referenzmarker, dessen Proteinexpression nach verschiedenen Behandlungen von CD34+-Zellen annähernd stabil blieb (Abb.13 A).

NF κ B gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren (p50, p52, p65, c-rel und RelB). Es besteht als Heteromer aus einer 50 kD und 65 kD Untereinheit und ist im inaktiven Zustand im Zytoplasma lokalisiert, wo es an das Inhibitorprotein I κ B- α gebunden ist (Baeuerle et al., 1989). Bei einer Aktivierung dissoziiert NF κ B von I κ B- α , wandert in den Zellkern und bindet an DNA, um die Genexpression zu regulieren (Siebenlist et al., 1994). NF κ B ist verantwortlich für die Expression verschiedener Genprodukte, die für die Hämatopoese relevant sind, wie IL-1 β , TNF- α , IL-6, M-CSF, GM-CSF, G-CSF, Erythropoietin, INF- γ (Pyatt et al., 1999). Zudem wird NF κ B durch Zytokine aktiviert, die für die Regulation der Hämatopoese verantwortlich sind (TNF- α , IF-1 α und IL-1 β , INF- γ , M-CSF, GM-CSF, TGF- β 1 und IL-3) und wirkt als „second messenger“. NF κ B und Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase werden im Knochenmark für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion von myeloiden und erythroiden Progenitorzellen benötigt (Bugarki et al., 2006). In einer früheren Studie wurde die Expression von NF κ B in humanen CD34 $^{+}$ -Zellen aus Knochenmark flowzytometrisch nachgewiesen und NF κ B eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Koloniebildung und das Überleben dieser Zellen zugeschrieben (Pyatt et al., 1999). Vor kurzem zeigte zudem die Analyse der Genexpression, dass Komponenten und Ziele der NF κ B-Signaltransduktion in CD34 $^{+}$ Zellen aus Nabelschnurblut überrepräsentiert sind im Vergleich zu CD34 $^{+}$ Zellen aus Knochenmark (Panepucci et al., 2007).

Dementsprechend liessen sich NF κ B und sein Inhibitor I κ B- α in der vorliegenden Arbeit in CD34 $^{+}$ - Zellen aus Nabelschnurblut mittels Westernblot eindeutig nachweisen. Sowohl nach Markierung mit Resovist und Lipofektin als auch nach alleiniger Behandlung mit Lipofektin zeigten sich keine Unterschiede in der Expression der regulatorischen Proteine NF κ B und I κ B gegenüber dem „house-keeping“ Protein β -Aktin (Abb.13 B,C). Da NF κ B und I κ B eine wichtige Rolle in der Regulation des Überlebens von HSZ spielen (Pyatt et al., 1999), spricht dieses Resultat dafür, dass die hier verwendete Markierungstechnik das Überleben der HSZ nicht beeinflussen kann.

Verschiedene Studien zeigen zudem, dass BCL-2 und Survivin nicht nur tumorspezifische Inhibitoren der Apoptose sind, sondern auch in der normalen adulten Hämatopoese eine regulatorische Funktion haben (Domen et al., 2001; Fukuda et al., 2001). Jedoch konnten BCL-2 und Survivin in unbehandelten und behandelten CD34⁺-Zellen aus humanem Nabelschnurblut in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Daher wurden diese Ergebnisse hier nicht weiter diskutiert.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Nabelschnurblut (NSB) wird zunehmend für die allogene Stammzelltransplantation und Therapie von Erkrankungen des blutbildenden Systems bei Kindern eingesetzt (Kurtzberg, 2009; Bradley et al., 2005). Hämatopoietische Stammzellen (HSZ) aus NSB von Neugeborenen haben gegenüber adulten Stammzellquellen (Knochenmark und peripherem Blut) den Vorteil, dass sie eine höhere HLA-Disparität des Empfängerbluts tolerieren und ein höheres Proliferations- und Rekonstitutionspotenzial aufweisen. Kritisch für den Erfolg einer Stammzelltherapie ist jedoch die geringere Gesamtzellzahl im Nabelschnurrestblut verglichen mit Knochenmark und das Homing-Verhalten transplanteder Zellen. Ziel dieser Arbeit war, eine effiziente und klinisch anwendbare Markierungstechnik für humane CD34+-Progenitorzellen aus NSB zu finden, um das Schicksal transplanteder Zellen in immundefizienten Mäusen mit Hilfe der MR-Bildgebung verfolgen zu können. Kriterien für das Markierungsprotokoll waren die Zytotoxizität und der Einfluss auf die kurz- und langfristige Differenzierungskapazität der Zielzellen. Zudem sollte mittels Westernblot ein potenzieller Einfluss der Eisenmarkierung auf die Expression von Proteinen geprüft werden, die an der Regulation von Apoptose und Überleben der HSZ beteiligt sind, wie NF κ B, I κ B α , BCL-2 und Survivin. Das „housekeeping“-Protein β -Aktin diente als interner Referenzmarker.

Methoden: Mononukleäre Stammzellen wurden aus aufgetautem NSB durch Zentrifugation im Ficoll-Dichtegradienten gewonnen. CD34+-Progenitorzellen wurden daraus angereichert durch magnetische Säulenseparation mittels monoklonaler Maus-Anti-Mensch CD34+-Antikörper, die an supramagnetische Partikel, MACS[®] oder „Microbeads“, gebunden waren. CD34+-Progenitorzellen wurden mit Komplexen aus eisenoxidhaltigen SPIOs (superparamagnetic iron oxide particles) (Resovist und Endorem) und Transfektionsagenz (Lipofektin) markiert und die Vitalität sowie der Apoptosegrad *in vitro* mittels Annexin-markiertem FITC und Propidiumiodid flowzytometrisch bestimmt. Die Messung des Differenzierungspotenzials erfolgte in „Colony Forming Assays“ (BFU-E; CFU-GM; CFU-GEMM nach 14 Tagen und CAFC nach 2 – 12 Wochen). Diese Parameter wurden mit Kontrollen ohne SPIO \pm Lipofektin verglichen.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Markierungsansätzen wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war. Ausserdem wurde die Expression von regulatorischen Proteinen in lysierten CD34+-Zellen aus NSB nach SDS-Gelelektrophorese im Westernblot analysiert.

Ergebnisse: Es liessen sich keine Veränderungen im Überleben und Apoptosegrad von CD34+-Zellen weder nach alleiniger Behandlung mit Lipofektin noch nach Markierung mit Resovist und Lipofektin gegenüber der Kontrolle nachweisen. Auch die kurz- und langfristige Differenzierungskapazität der Zellen wurde durch die Markierung nicht beeinträchtigt. Nur Endorem reduzierte die Koloniebildung der CFUs signifikant gegenüber den Kontrollen. Es waren auch keine Unterschiede in der Expression der regulatorischen Proteine NF κ B und I κ B α gegenüber dem „housekeeping“ Protein β -Aktin nachweisbar, unabhängig davon, ob Zellen mit Resovist und Lipofektin oder nur mit Lipofektin behandelt wurden.

Schlussfolgerungen: Diese Studie zeigt, dass die Markierung mit Resovist und Lipofektin die Vitalität und hämatopoietischen Funktionen von aufgetauten humanen CD34+-Progenitorzellen aus NSB *in vitro* nicht beeinträchtigt. Zudem kann die Wanderung markierter CD34+-Zellen zum Knochenmark in immundefizienten Mäusen nach intravenöser Injektion von 1×10^7 Zellen mittels klinischer 1,5 T MR-Bildgebung in einer Folgestudie nicht invasiv gemessen werden (Niemeyer et al., 2010). Die Resultate zur Proteinexpression von NF κ B und I κ B α lassen vermuten, dass die hier verwendete Markierungstechnik keinen Einfluss auf das Überleben von HSZ hat. Weitere Studien sollten diese Ergebnisse absichern.

5. Summary

Background: Umbilical cord blood (UCB) is increasingly used for children undergoing allogeneic stem cell transplantation and therapy for diseases of blood forming system (Kurtzberg, 2009; Bradley et al., 2005). Human hematopoietic stem cells (HSC) derived from UCB of new born child offer some advantages over adult stem cells derived from bone marrow or peripheral blood. These cells allow for a greater HLA-disparity between donor and recipient and show higher proliferative capacity and repopulating potential as compared with stem cells in bone marrow. Crucial to future success of stem cell therapy is the low overall number of cells in UCB compared with bone marrow and the homing behavior of transplanted cells. The goal of this study was to search for an efficient clinically applicable technique used for labeling human CD34+ progenitor cells from UCB in order to follow up the fate of transplanted cells in immunodeficient mice by MR-imaging. Criteria of labeling protocol were cytotoxicity and the effect on short-term and long term cell ability to differentiate. Furthermore by western blotting potential influence of labeling on expression of proteins was analysed, which are involved in the regulation of apoptosis and survival of HSC, like NF κ B, I κ B α , BCL-2 and Survivin. The housekeeping protein β -actin was used as internal reference marker.

Methods: Mononuclear stem cells were isolated from thawed NSB by ficoll-density gradient centrifugation. CD34+ progenitor cells were then obtained by magnetic cell enrichment using monoclonal mouse anti-human CD34-antibodies conjugated to super-paramagnetic microbeads (MACS[®]). CD34+ cells were labeled with iron oxide nanoparticles (SPIOs: Resovist and Endorem) and transfection agent (Lipofektin). Vitality and rate of apoptosis were monitored *in vitro* by flow cytometry after cell staining with FITC labeled annexin and propidium iodide. Functional capacity of cells was assessed in Colony Forming Assays (BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM in short-term cultures (14 days) and CAFC in long-term cultures (2 – 12 weeks)). These parameters were compared with controls without SPIO \pm Lipofektin. Differences between the experimental groups were considered significant if $p < 0,05$. Furthermore, expression of regulatory proteins was analysed in lysed CD34+ cells of UCB by western blotting.

Results: No differences in survival and rate of apoptosis were demonstrated in CD34+ cells compared with controls neither after sole treatment with Lipofektin nor after labeling with Resovist and Lipofektin. Also short-term and long-term differentiation of cells were not impaired by labeling. Only Endorem reduced hematopoietic progenitor colony formation significantly compared with control. No differences in expression of regulatory proteins NF κ B and I κ B α were detectable compared with housekeeping protein β -actin, regardless whether cells were treated with Resovist and Lipofektin or only with Lipofektin.

Conclusions: This study demonstrates, that labeling with Resovist and Lipofektin doesn't impair *in vitro* vitality and hematopoietic activity of human CD34+ stem cells of UCB. Further, migration of intravenously injected labeled CD34+ human stem cells to the bone marrow of immunodeficient mice can be monitored in a following study by clinical 1,5 T MR-imaging with detection limit of 1×10^7 cells (Niemeyer et al., 2010). Given the protein expression data of NF κ B and I κ B α , we believe that labeling technique used here doesn't have any adverse effect on survival of hematopoietic stem cell. Further studies have to support these results.

6. Literatur

1. Adonai N, Nguyen KN, Walsh J, Iyer M, Toyokuni T, Phelps ME, McCarthy DW, Gambhir SS: *Ex vivo* cell labeling with ^{64}Cu -pyruvaldehyde-bis(N^4 -methylthio-semicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(5): 3030-3035
2. Ahmed F, Ings SJ, Pizzey AR, Blundell MP, Thrasher AJ, Ye H, Fahey A, Linch DC und Yong KL: Impaired bone marrow homing of cytokine-activated CD34+ cells in the NOD/SCID model. *Blood* 2004; 103(6): 2079-2087
3. Altieri DC: Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(3): 478-482
4. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H und Frank JA: Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* 2003; 229: 838-846
5. Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA: Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 2004; 104: 1217-1223
6. Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, Khakoo AY, Fellowes V, Read EJ und Frank JA: Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells. *NMR Biomed* 2005; 18: 553-559
7. Askenasy N, Farkas DL: Optimal imaging of PKH-labeled hematopoietic cells in recipient bone marrow in vivo. *Stem Cells* 2002; 20(6): 501-513

8. Baeuerle PA, Baltimore D: I κ B: A specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science* 1988; 242: 540
9. Barker JN, Krepski TP, DeFort TE: Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood vs bone marrow. *Biol Blood Bone Marrow Transplant* 2002; 8: 257-260
10. Barker JN und Wagner JE: Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 526-532
11. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM und Wagner JE: Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005; 105(3): 1343-1347
12. Barkhausen J, Quick MS, Lauenstein T, Goyen M, Ruehm SG, Laub G, Debatin JF, Ladd ME: Whole-body MR imaging in 30 seconds with real-time true FISP and a continuously rolling table platform: feasibility study. *Radiology* 2001; 220: 252-256
13. Benito AI, Diaz MA, Gonzalez-Vicent M: Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 675-690
14. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H: Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22: 625-634
15. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK: Cel transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007; 38: 817-826

16. Bonde J, Hess DA und Nolte JA: Recent advances in hematopoietic stem cell biology. *Current Opinion in Hematology* 2004; 11: 392-398
17. Bonnet D: Haematopoietic stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 430-440
18. Bourget P, Blanc-Vincent MP, Boneu A, Bosquet L, Chauffert B, Corone C, Courbon F, Devillers A, Foehrenbach H, Lumbroso JD, Mazselin P, Montravers F, Moretti JL, Talbot JN: Summary of the standards, options and recommendations for the use of positron emission tomography with 2-(18F) fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG-PET scanning) in Oncology (2002). *Br J Cancer* 2003; 89 Suppl1. 84-91
19. Bradford MM: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
20. Bradley MB und Cairo MS: Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Human Immunology* 2005; 66: 431-446
21. Breems DA, Blokland EA, Neben S und Ploemacher RE: Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. *Leukemia* 1994; 8(7): 1095-1104
22. Brenner W, Aicher A, Eckey T, Massoudi S, Zuhayra M, Koehl U, Heeschen C, Kampen WU, Zeiher AM, Dimmeler S, Henze E: ¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *J Nucl Med* 2004; 45(3): 512-518
23. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S: Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4109-4113

24. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, Defor TE, Gooley TA, Verneris MR, Appelbaum FR, Wagner JE und Delaney C: Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood* 2010; 116(22): 4693-4699
25. Bugarski D, Krstic A, Mojsilovic S, Vlaski M, Petakov M, Jovcic G, Stojanovic N, Milenkovic P: Signaling pathways implicated in hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation. *Exp Biol Med* 2006; 232: 156-163
26. Bull BS, Huse WM, Brauer FS, Korpman RA: Heparin therapy extracorporeal circulation. II: the use of dose-response curve to individualize heparin and protamine dosage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 69: 685-689
27. Bulte JWM, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID und Frank JA: Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and *in vivo* tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1141-1147
28. Buske C, Glimm H und Feuring-Buske M: Hämatopoetische Stammzelltherapie – Biologische Grundlagen. *Der Internist* 2006; 47: 459-466
29. Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S: Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008; 45: 514-522
30. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE: Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001; 32: 2682-2688
31. Choi S, Tang X-W, Cory DG: Constant time imaging approaches to NMR Microscopy. *Int J Imaging Syst Technol* 1997; 8: 263-276

32. Chute JP: Stem cell homing. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 399-406
33. Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, Davis J, Noga S: Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2224-2233
34. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C: Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 9836-9841
35. Cory S, Huang DC, Adams JM: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-8607
36. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RAJ, Settles M, Piontek G, Metz S, Rosenbrock H, Keller U, Heinzmann U, Rummeny EJ, Schlegel J und Link T: Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology* 2003; 228: 760-767
37. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Metz S, Piontek G, Pichler B, Settles M, Heinzmann U, Schlegel J, Oostendorp RAJ, Rummeny EJ: Cell tracking with gadophrin-2: a bifunctional contrast agent for MR imaging, optical imaging, and fluorescence microscopy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31: 1312-1321
38. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Piontek G, Metz S, Bräuer R, Debus G, Corot C, Schlegel J, Link TM, Peschel C, Rummeny EJ und Oostendorp RAJ: Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: In vivo monitoring with 1,5-T MR imaging equipment. *Radiology* 2005a; 234: 197-205
39. Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RAJ, Jacobs VR, Simon GH, Gooding C, Rummeny EJ: Comparison of iron oxide labeling properties of

hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood and from peripheral blood for subsequent in vivo tracking in a xenotransplant mouse model XXX. *Acad Radiol* 2005b; 12: 502-510

40. Daldrup-Link HE, Mohanty A, Cuenod C, Pichler B, Link T: New perspectives on bone marrow contrast agents and molecular imaging. *Semin Musculoskelet Radiol* 2009; 13: 145-156
41. Dao MA, Arevalo J, Nolta JA: Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. *Blood* 2003; 101: 112-118
42. Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA. Flow Cytometry. 2nd Edition 1994
43. DiGiusto DL, Lee R, Moon J, Moss K, O'Toole T, Voytovich A, Webster D, Mule JJ: Hematopoietic potential of cryopreserved and ex vivo manipulated umbilical cord blood progenitor cells evaluated in vitro and in vivo. *Blood* 1996; 87: 1261
44. Djakovic A und Dietl J: Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurblut verwandter und nicht verwandter Spender bei Kindern und Erwachsenen – eine Übersicht zum Stammzelltransplantationswesen aus Nabelschnurblut. *Z Geburtsh Neonatol* 2005; 209: 159-166
45. Domen J: The role of apoptosis in regulating hematopoietic stem cell numbers. *Apoptosis* 2001; 6: 239-252

46. Eapen M, Rubinstein P, Zhang M-J, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradovou A, Loberiza FR, Champlin RE, Klein JP, Horowitz MM und Wagner JE: Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 2007; 369: 1947-1954
47. Eapen M und Wagner JE: Transplant outcomes in acute leukemia (I). *Semin Hematol* 2010; 47(1): 46-53
48. Ende N, Chen R: Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood. *J Med* 2002; 33: 173-180
49. Engelhardt M, Deschler B, Müller C und Lübbert M: Plastizität adulter Stammzellen: Wunschtraum oder Realität? *Deutsches Ärzteblatt* 2003; Jg. 100, Heft 49: A3236-A3244
50. Erices A, Conget P, Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242
51. Fallahi-Sichani M, Soleimani M, Najafi SM, Kiani J, Arefian E, Atashi A: *In vitro* differentiation of cord blood unrestricted somatic stem cells expressing dopamine-associated genes into neuron-like cells. *Cell Biol Int* 2007; 31: 299-303
52. Fauser A.A. Stammzellsystem. In: Hämatologie/Onkologie (Hrsg. Ostendorf, Seeber; Verlag Urban & Schwarzenberg) 1997
53. Fawwaz R, Oluwole R, Wang N.: Biodistribution of radiolabeled lymphocytes. *Radiology* 1985; 155: 483-486
54. Ferrucci JT, Stark DD: Iron oxide-enhanced MR imaging of the liver and spleen: review of the first 5 years. *Am J Roentgenol* 1990; 155: 943-950

55. Frank JA, Miller BR, Arbab AS, Zywicke HA, Jordan EK, Lewis BK, Bryant LH und Bulte JWM: Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* 2003; 228: 480-487
56. Fukuda S, Pelus LM: Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34+ cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 2001; 98(7): 2091-2100
57. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC: Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 255-270
58. Ghodsizad A, Niehaus M, Kögler G, Martin U, Wernet P, Bara C: Transplanted human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells improve left-ventricular function and prevent left-ventricular dilation and scar formation after acute myocardial infarction. *Heart* 2009; 95: 27-35
59. Gillies RJ: In vivo molecular imaging. *J Cell Biochem Suppl* 2002; 39: 231-238
60. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD.: *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: 1174-1178
61. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A: 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: 373-381

62. Gluckman E, Rocha V, Chevret S: Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 146-154
63. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan K-W, Takahashi TA, Ortega J, Filipovich A, Locatelli F, Asano S, Fagioli F, Vowels M, Sirvent A, Laporte J-P, Tiedemann K, Amadori S, Abecassis M, Bordignon P, Diez B, Shaw PJ, Vora A, Caniglia M, Gernier F, Ionescu I, Garcia J, Koegler G, Rebullia P, Chevret S (Eurocord Group): Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: Guidelines for donor choice. *Experimental Hematology* 2004; 32: 397-407
64. Gluckman E und Rocha V: Cord blood transplant: strategy of alternative donor search. *Springer Semin Immunopathol* 2004; 26(1-2): 143-154
65. Götze KS, Schiemann M, Marz S, Jacobs VR, Debus G, Peschel C, Oostendorp RA: CD133-enriched CD34(-)(CD33/CD38/CD71)(-) cord blood cells acquire CD34 prior to cell division and hematopoietic activity is exclusively associated with CD34 expression. *Exp Hematol* 2007; 35(9): 1408-1414
66. Greschat S, Schira J, Kury P, Rosenbaum C, de Souza Silva MA, Kögler G: Unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood can be differentiated into neurons with a dopaminergic phenotype. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 221-232
67. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE: Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood* 2003; 101(11): 4233-4244
68. Hacein-Bey-Abina S, Von KC, Schmidt M: A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348(3): 255-256

69. Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L: Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated based on aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 2004; 104: 1648-1655
70. Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA, Varney TR, Balaban RS, Koretsky AP und Dunbar CE: Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* 2003; 102(3): 867-872
71. Högemann D, Josephson L, Weissleder R, Basilion J: Improvement of MRI probes to allow efficient detection of gene expression. *Bioconjugate Chem* 2000; 11: 941-946
72. Iori AP, Cerretti R, De Felice L: Pre-transplant prognostic factors for patients with high-risk leukemia undergoing an unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 1097-1105
73. Iscove NN, Senn JS, Till JE, McCulloch EA: Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: Effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood* 1971; 37: 1-5
74. Jacobs VR, Niemeyer M, Gottschalk N, Schneider KTM, Kiechle M, Oostendorp RAJ, Peschel C, Hönicka M, Lehle K, Birnbaum D, Meyer TPH, Rapp S, Burkhardt J, Aigner J, Eblenkamp M und Wintermantel E: Das STEMMAT-Projekt als Teil der Gesundheitsinitiative BayernAktiv: Adulte Stammzellen aus Nabelschnur und –blut als Alternative zur embryonalen Stammzellforschung. *Zentralbl Gynakol* 2005; 127: 368-372
75. Jäger M, Sager M, Knipper A, Degistrici Ö, Fischer J, Kögler G, Wernet P und Krauspe R: In-vitro- und in-vivo-Knochenregenerierung durch

- mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. *Orthopäde* 2004; 33: 1361-1372
76. Jäger M, Degistrici Ö, Knipper J, Sager M, Krauspe R: Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 1224-1233
77. Jobin Ch und Balfour Sartor R: The I κ B / NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C451-C462
78. Kalish H, Arbab AS, Miller BR, Lewis BK, Zywicke HA, Bulte JW, Bryant LH, Frank JA: Combination of transfection agents and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging: relationship between relaxivities, electrostatic forces, and chemical composition. *Magn Reson Med* 2003; 50: 275-282
79. Kim BO, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wendt S: Cell transplantation improves ventricular function after a myocardial infarction: a preclinical study of human unrestricted somatic stem cells in a porcine model. *Circulation* 2005; 112: 196-1104
80. Kirik D, Breyse N, Björklund T, Besret L, Hantraye P: Imaging in cell-based therapy for neurodegenerative diseases. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32, Suppl 2: S417-S434
81. Knaän-Shanzer S, Van der Velde-Van Dijke I, Van de Watering MJM; De Leeuw PJ, Valerio D, Van Bekkum DW und De Vries AAF: Phenotypic and functional reversal within the early human hematopoietic compartment. *Stem Cells* 2008; 26: 3210-3217
82. Koch AM, Reynolds F, Kircher MF: Uptake and metabolism of a dual fluorochrome Tat-nanoparticle in HeLa cells. *Bioconjug Chem* 2003; 14: 1115-1121

83. Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N: A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004; 200; 123-135
84. Kögler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV: Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* 2005; 33: 573-583
85. Kögler G, Sensken S, Wernet P: Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Exp Hematol* 2006; 34: 1589-1595
86. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA und Weissman IL: Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for clinical application. *Ann Rev Immunol* 2003; 21: 759-806
87. Kongress Report aktuell Nr. 1042 in Gynäkologie und Geburtshilfe Nr. 1 / 2008
88. Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E: In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 2003; 107: 2290-2293
89. Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD: Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112: 1451-1461
90. Kurtzberg J: Update on umbilical cord blood transplantation. *Current Opinion in Pediatrics* 2009; 21: 22-29

91. Kyhse-Andersen J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984; 10: 203-209;
92. Lanzkron SM, Collector MI und Sharkis SJ: Hematopoietic stem cell tracking in vivo: A comparison of short-term and long-term repopulating cells. *Blood* 1999; 93(6): 1916-1921
93. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J: Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001; 344: 1815-1822
94. Lee MW, Jang IK, Yoo KH, Sung KW und Koo HH: Stem and progenitor cells in human umbilical cord blood. *Int J Hematol* 2010; 92(1): 45-51
95. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH: Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-1675
96. Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT und Weissleder R: Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 410-414
97. Lewis ID, Verfaillie CM: Multi-lineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors: superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 2000; 28: 1087-

98. Lewis ID, Almeida-Porada G, Du J, Lemischka IR, Moore KA, Zanjani ED, Verfaillie CM: Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system. *Blood* 2001; 97: 3441-
99. Link H, Arseniev L, Bahre O, Kadar JG, Diedrich H, Poliwoda H: Transplantation of allogeneic CD34+ blood cells. *Blood* 1996; 87: 4903-4909
100. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, Messina C, Ortega J, Badell-Serra I, Plouvier E, Souillet G, Jouet JP, Pasquini R, Ferreira E, Garnier F, Gluckman E: Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood* 1999; 93: 3662-
101. Long GD, Laughlin M, Madan B: Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 772-780
102. Maxwell DJ, Bonde J, Hess DA, Hohm SA, Lahey R, Zhou P, Creer MH, Piwnica-Worms D, Nolte JA: Fluorophore-conjugated iron oxide nanoparticle labeling and analysis of engrafting human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 517-524
103. Mayani H, Lansdorp PM: Biology of human umbilical cord blood-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998; 16: 153-165
104. McNiece I, Kubegov D, Kerzic P, Shpall EJ, Gross S: Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Exp Hematol* 2000; 28: 1181

105. Meng ZT, Gao jT, Lu SH, Yan X, Li YH, Yang Z, Zheng YZ: Intra-bone marrow infusion of human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells improves hematopoietic reconstitution in NOD-SCID mice. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2009; 17(4): 1010
106. Metz S, Bonterra G, Rudelius M, Settles M, Rummeny EJ and Daldrup-Link HE: Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *European Radiology* 2004; 14(10): 1851-1858
107. Michallet M, Philip T, Philip I, Godinot H, Sebban C: Transplantation with selected autologous peripheral blood CD34+Thy1+hematopoietic stem cells (HSCs) in multiple myeloma: impact of HSC dose on engraftment, safety, and immune reconstitution. *Exp Hematol* 2000; 28: 858-870
108. Michel G, Rocha V, Chevret S: Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis. *Blood* 2003; 102: 4290-4297
109. Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK und Danenberg PV: Both β -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *The Prostate* 2008; 68(14): 1555-1560
110. Morrison SJ und Weissman IL: The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994; 1: 661-667
111. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE und Weissman IL: Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 1997; 124: 1929-1939

112. Newman MB, Willing AE, Manresa JJ, Sanberg CD, Sanberg PR: Cytokines produced by cultured human umbilical cord blood (HUCB) cells: implications for brain repair. *Exp Neurol* 2006; 199: 201-208
113. Niemeyer M, Oostendorp RAJ, Kremer M, Hippauf S, Jacobs VR, Baurecht H, Ludwig G, Piontek G, Bekker-Ruz V, Timmer S, Rummeny EJ, Kiechle M, Beer AJ: Noninvasive tracking of human hematopoietic CD34+stem cells in vivo in immunodeficient mice using magnetic resonance imaging. *Eur Radiol* 2010; 20(9): 2184-2193
114. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto k, Ikegami Y: The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007; 25: 2017-2024
115. Noort WA, Willemze R, Falkenburg JH: Comparison of repopulating ability of hematopoietic progenitor cells isolated from human umbilical cord blood or bone marrow cells in NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22(Suppl1): S58-S60
116. Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R: Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur Radiol* 2003; 13(1): 195-208
117. Ntziachristos V, Tung CH, Bremer C: Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nat Med* 2008; 8(7): 757-760
118. Ooi J, Iseki T, Takahashi S: A clinical comparison of unrelated cord blood transplantation and unrelated bone marrow transplantation for adult patients with acute leukaemia in complete remission. *Br J Haematol* 2002; 118: 140-143

119. Oostendorp RAJ (TU München): Koloniekurs Cellsystems, Troisdorf April 2005
120. Ott I, Keller U, Knoedler M, Götze KS, Doss K, Fischer P, Urlbauer K, Debus G, von Bubnoff N, Rudelius M, Schömig A, Peschel C und Oostendorp RA: Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *FASEB J* 2005; 19(8): 992-994
121. Panepucci RA, Calado RT, Rocha V, Proto-Siqueira R, Silva WA, Zago MA: Higher expression of transcription targets and components of the nuclear factor- κ B pathway is a distinctive feature of umbilical cord blood CD34+ precursors. *Stem Cells* 2007; 25: 189-196
122. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, Dane A, Gammaitoni L, Fagioli F, Perissinotto E, Cavalloni G, Kollet O, Lapidot T, Aglietta M: Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood* 1999; 93: 3736-
123. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL: One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 Suppl 1: 11917-11923
124. Pyatt DW, Stillman WS, Yang Y, Gross S, Zheng J, Irons RD: An essential role for NF- κ B in human CD34+ bone marrow cell survival. *Blood* 1999; 93(10): 3302-3308
125. Radbruch A: Flow Cytometry and Cell Sorting 2000

126. Re D und Wolf J: Grundlagen der Hämatopoese *in: Medizinische Therapie* (Hrsg. Schölmerich Jürgen; Springer-Verlag) 2007/2008, Seite 304-306
127. Reader AJ, Zweit J: Developments in whole-body molecular imaging of live subjects. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 604-607
128. Reimann V, Creutzig U und Kögler G: Stammzellen aus Nabelschnurblut in der Transplantations- und regenerativen Medizin. *Deutsches Ärzteblatt* 2009; Jg. 106, Heft 50: 831-836
129. Reiser M, Semmler W: Magnetresonanztomographie. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2002
130. Rennen HJ, Boerman OC, Oyen WJ und Corstens FH: Imaging infection / inflammation in the new millennium. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: 241-252
131. Renström J, Kröger M, Peschel C, Oostendorp RAJ: How the niche regulates hematopoietic stem cells? *Chem Biol Interact* 2009, doi:10.1016/j.cbi.2009.11.012
132. Rocha V, Sanz G, Gluckman E: Umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 375-385
133. Rudelius M, Daldrup-Link HE, Heinzmann U, Piontek G, Settles M, Link TM und Schlegel J: Highly efficient paramagnetic labeling of embryonic and neuronal stem cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 1038-1044
134. Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR: Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; 12: 271-278

135. Scharl M, Gessler M und von Eckardstein A: Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. 1. Auflage 2009, Seite 756; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München
136. Schoepf U, Marecos E, Melder R, Jain R, Weissleder R: Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. *Biotechniques* 1998; 24: 642-651
137. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K: Structure, regulation and function of NF- κ B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405
138. Shah K, Jacobs A, Breakefield XO und Weissleder R: Molecular imaging of gene therapy for cancer. *Gene Therapy* 2004; 11: 1175-1187
139. Shah K und Weissleder R: Molecular optical imaging: applications leading to the development of present day therapeutics. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2005; 2: 215-225
140. Shi-Xia X, Xian-Hua T und Xiang-Feng T: Unrelated umbilical cord blood transplantation and unrelated bone marrow transplantation in children with hematological disease: a meta-analysis. *Pediatr Transplant* 2009; 13(3): 276-284
141. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, Bearman SI, Nieto Y, Freed B, Madinger N, Hogan CJ, Slat-Vasquez V, Russell P, Blunk B, Schissel D, Hild E, Malcolm j, Ward W, McNiece IK: Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002; 8: 368

142. Sudchada P, Oo-Puthinan S, Kerdpin O und Saelim N: ABCB1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells in healthy Thai males and females. *Genet Mol Res* 2010; 9(2): 1177-1185
143. Sun S, Yi X, Poon RTP, Yeung C, Day PJR, Luk JM: A protein-based set of reference markers for liver tissues and hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9: 309
144. Syková E, Jendelová P: Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* 2006; 3(1-2): 62-67
145. Syková E, Jendelová P, Herynek V: MR tracking of stem cells in living recipients. Neil J Scolding and David Gordon (eds.) in: *Methods in Molecular Biology, Neural Cell Transplantation*. 2009; Vol 549, p. 197-215; Humana Press, Springer Science + Business Media
146. Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Oiwa-Monna M, Fukuno k, Uchiyama M, Takasugi K, Iseki T, Tojo A, Yamaguchi T, Asano S: 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): 1322-1330
147. Tang Y, Shah K, Messerli SM, Snyder E, Breakefield XO, Weissleder R: In vivo tracking of neuronal progenitor cell migration to glioblastomas. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1247-1254
148. Trapp T, Kögler G, El-Khattouti A, Sorg RV, Besselmann M, Focking M: Hepatic growth factor /c-MET axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury. *J Biol Chem* 2008; 283: 32244-32253

149. Vandekerckhove J, Weber K: Actin amino-acid sequences – Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV40-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin. *Eur J Biochem* 1978; 90(3): 451-462
150. Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD: Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 595-604
151. Voermans C, Van Hennik PB and Van der Schoot CE: Homing of human hematopoietic stem and progenitor cells: New insights, new challenges? *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 2001; 10: 725-738
152. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NKC, Davies SM: Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100 (5): 1611-1618
153. Wagner JE, Laughlin M, Petz L: Seventh annual international umbilical cord blood transplantation symposium, Los Angeles, California, June 5-6, 2009. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009
154. Wang JC, Doedens M, Dick JE: Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* 1997; 89: 3919-3924
155. Weissleder R, Stark D, Engelstad B, Bacon B, Compton C: Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am J Roentgenol* 1989; 152: 167-173

156. Weissleder R, Cheng H, Bogdanova A, Bogdanov A: Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 1997; 7: 258-263
157. Xiao J, Nan Z, Motooka Y, Low WC: Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 722-733
158. Yeh T, Zhang W, Ildstad S, Ho C: In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron oxide particles. *Magn Reson Med* 1995; 33: 200-208
159. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F: Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; 109: 1801-1809
160. Zhang J, Brown R, Heye M, Welhausen S, Nett A, Burke C, Herzig RH: Optimization of ex vivo expansion conditions with different growth factor combinations and concentrations maintaining long term engrafting ability of umbilical cord blood CD34+ stem cells [abstract]. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 80
161. Zhang Y, Ruel M, Beanlands RS, deKemp RA, Suuronen EJ, DaSilva JN: Tracking stem cell therapy in the myocardium: applications of positron emission tomography. *Curr Pharm Des* 2008; 14(36): 3835-3853
162. Zhao M, Kircher MF, Josephson L: Differential conjugation of tat peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on cellular uptake. *Bioconjug Chem* 2002; 13: 840-844
163. Zhong XY, Zhang B, Asadollahi R, Low SH und Holzgreve W: Umbilical cord blood stem cells: what to expect. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1205: 17-22

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

APS.....	Ammonium Persulfat
BSA.....	bovine serum albumin
BFU-E.....	burst forming unit erythroid
CAFC.....	cobble-stone area-forming cells
CD.....	cluster of differentiation
CFU-GM.....	colony-forming units of granulocyte / macrophage
CFU-GEMM.....	colony-forming units of granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte
CML.....	chronic myeloid leukemia
CSF.....	colony stimulating factor
d.....	Tag
DTT.....	Dithiothreitol
FACS.....	fluorescence activated cell sorting
FITC.....	Fluorescein-Isothiocyanat
FMT.....	fluorescence-mediated tomography
Gd.....	Gadolinium
GvHD.....	Graft-versus-Host-Disease
h.....	Stunde
HGF.....	Hepatocyte growth factor
HLA.....	human leucocyte antigen
HSZ.....	Hämatopoetische Stammzellen
IL-3.....	Interleukin-3
kDa.....	Kilo Dalton
MRT.....	Magnetresonanztomographie
MSC.....	mesenchymale Stromazellen
NIRF.....	Near Infrared Fluorescence Reflectance Imaging
NOD/SCID-Maus	non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency
NSB.....	Nabelschnurblut
PBS.....	phosphate buffered saline
PET.....	Positronen-Emissions-Tomographie
PLL.....	Poly-L-Lysin
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE.....	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPECT.....	Single Photon Emission Computed Tomography
SPIO.....	Superparamagnetic iron oxide particles
TEMED.....	Tetramethylethyldiamin
TNF α	Tumor necrosis factor α
TA.....	Transfektionsagenz
vs.....	Versus
USSC.....	Unrestrictierte Stammzellen

7.2. Kopie einer publizierten Folgestudie

Markus Niemeyer
Robert A. J. Oostendorp
Markus Kremer
Sandra Hippauf
Volker R. Jacobs
Hansjörg Baurecht
Georg Ludwig
Guido Piontek
Viktoria Bekker-Ruz
Sebastian Timmer
Ernst J. Rummeny
Marion Kiechle
Ambros J. Beer

Non-invasive tracking of human haemopoietic CD34⁺ stem cells in vivo in immunodeficient mice by using magnetic resonance imaging

Received: 31 August 2009
Revised: 4 February 2010
Accepted: 5 February 2010
Published online: 15 April 2010
© European Society of Radiology 2010

M. Niemeyer (✉) · V. R. Jacobs · S. Timmer · M. Kiechle
Department of Gynaecology,
Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität München,
Ismaninger Str. 22, 81675 Munich,
Germany
e-mail: markus.niemeyer@gmx.net
Tel: +49-89-41402420
Fax: +49-89-41404811

R. A. Oostendorp · S. Hippauf · V. Bekker-Ruz
Department of Oncology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675, Munich, Germany

R. Oostendorp
e-mail: oostendorp@lrz.tum.de

S. Hippauf
e-mail: sandri_sunshine@web.de

V. Bekker-Ruz
e-mail: viktoriaruz@hotmail.com

M. Kremer
Department of Pathology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 Munich, Germany
e-mail: kremer@lrz.tum.de

H. Baurecht
Department of Statistics, Klinikum rechts der Isar, Institute for Medical Statistics and Epidemiology, Technische Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 Munich, Germany
e-mail: baurecht@lrz.tum.de

G. Ludwig · E. J. Rummeny · A. J. Beer
Department of Radiology, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 Munich, Germany

G. Ludwig
e-mail: redfrogG.L@web.de

E. J. Rummeny
e-mail: rummeny@roe.med.tu-muenchen.de

G. Piontek
Department of Neuropathology,
Technische Universität München,
Ismaninger Str. 22, 81675 Munich,
Germany
e-mail: piontek@neuropatho.de

Present Address:

A. J. Beer
Department of Nuclear Medicine,
Technische Universität München,
Munich, Germany
e-mail: beer@roe.med.tu-muenchen.de

Abstract

Objective To assess migration of CD34⁺ human stem cells to the bone marrow of athymic mice by using magnetic resonance (MR) imaging and Resovist, a contrast agent containing superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. **Methods** All animal and human procedures were approved by our institution's ethics committee, and women had given consent to donate umbilical cord blood (UCB). Balb/c-AnN Foxn1^{nu}/Cr1 mice

received intravenous injection of 1×10^6 ($n=3$), 5×10^6 ($n=3$) or 1×10^7 ($n=3$) human Resovist-labelled CD34⁺ cells; control mice received Resovist ($n=3$). MR imaging was performed before, 2 and 24h after transplantation. Signal intensities of liver, muscle and bone marrow were measured and analysed by ANOVA and post hoc Student's *t* tests. MR imaging data were verified by histological and immunological detection of both human cell surface markers and carboxydextran-coating of the contrast agent. **Results** CD34⁺ cells were efficiently labelled by Resovist without impairment of functionality. Twenty-four hours after administration of labelled cells, MR imaging revealed a significant signal decline in the bone marrow, and histological and immunological analyses confirmed the presence of transplanted human CD34⁺ cells.

Conclusion Intravenously administered Resovist-labelled CD34⁺ cells home to bone marrow of mice. Homing can be tracked in vivo by using clinical 1.5-T MR imaging technology.

Keywords Magnetic resonance imaging · Cell tracking · Haemopoietic CD34 stem cells · Superparamagnetic iron oxide particles · Bone marrow homing

Introduction

For years, unrelated transplantation of haemopoietic stem cells has been used to regenerate the blood system after chemotherapy, or to treat otherwise incurable malignant and non-malignant disorders [1, 2]. Umbilical cord blood (UCB) is emerging as a valuable source of unrelated haemopoietic stem cells because UCB-derived stem cells tolerate greater human leukocyte antigen (HLA) disparity than stem cells derived from other sources [3, 4].

Among the UCB-derived cells, only CD34⁺ cells initiate long-term repopulation [5]. Transplantation of purified CD34⁺ has been shown to reduce the negative impact of HLA disparity on survival after unrelated UCB transplantation [6, 7]. Transplanted CD34⁺ stem cells need to home to the bone marrow to enable durable repopulation and multilineage differentiation [8]. As transplanted CD34⁺ cells might also migrate to other organs before bone marrow homing, precise monitoring on the migration of transplanted cells is a prerequisite for the development of stem cell therapies [9].

One approach to monitoring cell migration is to detect magnetically labelled, transplanted cells by magnetic resonance (MR) imaging. MR imaging allows the non-invasive, repetitive analysis of the migration of transplanted cells in vivo. Furthermore, MR imaging has been favoured because of its high resolution and sensitivity [10, 11]. Cellular imaging by MR requires effective labelling of cells with appropriate MR contrast agents. Superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles have been frequently used for cell tracking experiments. As SPIO uptake by non-phagocytic or slow-dividing CD34⁺ cells is poor, we and others have developed labelling techniques with substantial advantages in terms of labelling effectiveness by using polycationic transfection agents (TA) and clinically used SPIO particles [12–16].

Previous studies used the whole mononuclear cell population for labelling and transplantation experiments [17]. However, this cell population contains monocytes, which are capable of phagocytosis of SPIO; therefore, the signal detected does not truly reflect the most relevant population of CD34⁺ stem cells. Because CD34⁺ cells are only a tiny proportion of this population, the changes in MR signal intensity caused by iron oxide-labelled mononuclear cells only partially reflect cells capable of repopulating the haemopoietic system. The novelty of our study in comparison with the above-mentioned work is the dedicated labelling and tracking of CD34⁺ stem cells. Other studies also labelled human UCB-derived CD34⁺ cells, but they applied growth factor and protamine sulphate-supplemented procedures [18]. However, cytokine preculture has been shown to affect the homing behaviour of cells [19]. Our protocol has the advantage of being very simple and minimally invasive, thus minimising the possibility of altering the homing behaviour of the stem cells.

Because only CD34⁺ cells localised to the bone marrow can initiate long-term repopulation of haemopoietic stem

cells, we asked whether migration of intravenously injected CD34⁺ human stem cells to the bone marrow of athymic mice can be monitored in vivo. To answer this question, we labelled anti-CD34 antibody-selected human cord blood cells by using clinically approved SPIO particles and monitored the bone marrow homing of transplanted cells by using conventional 1.5-T MR imaging.

Materials and methods

Isolation of CD34⁺ cells

Human cord blood was obtained from normal full-term pregnancies or caesarean sections after parental consent. Cord blood was collected in collection bags containing citrate buffer (Austrian Red Cross, Eugendorf, Austria). All procedures were approved by the ethics committee of the Technical University of Munich. Human mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation. As large numbers of cells were required, mononuclear cells were cryopreserved in pools from up to five donors and stored until required in the vapour phase of liquid nitrogen in 10% dimethyl sulphoxide (Sigma, St Louis, MO, USA) in foetal calf serum (PAN). For experiments, cryopreserved cells from up to 100 donors were thawed in a water bath at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% foetal bovine serum, 4 mmol/L L-glutamine, and 50 mg/mL penicillin and streptomycin. Monocytes were separated by Ficoll gradient centrifugation. Next, CD34⁺ cells were positively selected to a purity of greater than 95% by magnetic cell enrichment by using monoclonal mouse anti-human CD34 antibodies conjugated to magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Labelling procedures

Two SPIO-containing contrast agents, Resovist (Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Germany) and Endorem (Guerbet S.A., Roissy, France), were used [3, 4]. Resovist is a clinically approved carboxydextran-coated SPIO with an average hydrodynamic diameter of 60 nm. Its iron oxide particles have an R1 relaxivity of 9.7 mM⁻¹ s⁻¹ and an R2 relaxivity of 189 mM⁻¹ s⁻¹ at 37°C and 1.5 T. Endorem is a dextran-coated ferumoxide. Its particle size is 120–180 nm and particles have an R1 relaxivity of 10.1 mM⁻¹ s⁻¹ and an R2 relaxivity of 120 mM⁻¹ s⁻¹ at 37°C and 1.5 T. To label CD34⁺ cells with SPIO, the liposomal agent Lipofectamine (Invitrogen, Berlin, Germany) was applied. Contrast agents at a dose of 20 µg Fe were pre-mixed with 20 µL Lipofectamine in a total volume of 100 µL DMEM and incubated for 30 min at 37°C to allow complex formation. Then, the final volume

was increased to 0.8 mL of contrast medium and SPIO–Lipofectamine complexes were added to the cells. Cells were incubated for 4 h under standard cell culture conditions (37°C, 5% CO₂). After the incubation, cell samples were washed at least three times with HF/2+ medium (Hank's balanced salt solution (Invitrogen, Berlin, Germany) supplemented with 2% foetal calf serum (PAN Biosystems), penicillin/streptomycin (Invitrogen, Berlin, Germany) and 10 mmol/L HEPES buffer (Invitrogen, Berlin, Germany)) to eliminate residual contrast agent particles. Afterwards, cells were resuspended in 0.3 mL HF/2+ medium and filtered through a 30-µm Filcon filter (BD Immunocytometry Systems, Erembodegem, Belgium) to avoid cell agglutination. To determine the effectiveness of the labelling procedure, intracellular SPIO particles were microscopically detected after Prussian blue staining, thereby excluding the presence of extracellular, membrane-associated SPIO–Lipofectamine complexes. Iron oxide-labelled cells were counted in a Neubauer counting chamber. For *in vitro* MR imaging, unlabelled and labelled cells (1×10^6) were centrifuged in Eppendorf tubes and subsequently positioned in a water bath which was positioned in the birdcage coil. Detergent was added to the water to remove formation of air bubbles thereby avoiding susceptibility artefacts. T2*-weighted MR imaging was subsequently performed.

In vitro assays for mature and immature progenitor cells

For the detection of apoptosis, CD34⁺ cells were collected before and after labelling procedures (Lipofectamine or Lipofectamine + Resovist), washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled annexin V (BD Biosciences). Membrane permeability was monitored by using the DNA dye propidium iodide (1 µg/mL, Invitrogen). The rate of apoptosis was determined by flow cytometry. Flow cytometric data were analysed by using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA). According to both the manufacturer's instructions and initial experiments, apoptosis assay was performed 4 h after labelling.

Functional capacity of fresh, thawed, labelled and unlabelled CD34-selected cells was assessed in cell culture in growth factor-supplemented semi-solid medium (H4345, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) and in long-term cultures on FBMD-1 stromal cells as described previously [17, 20]. Haemopoietic colonies (BFU-E, CFU-GEMM and CFU-GM) were counted by using standard criteria. Assessment of cobblestone area-forming cells (CAFC) was performed as described previously [21]. In brief, confluent stromal layers were overlaid with labelled or unlabelled CD34⁺ cells in a limiting dilution setup with 20 replicates per dilution. After 2, 6, 8, 10 and 12 weeks, the frequency of CAFC was determined by using the L-Calc software package (Stem Cell Technologies).

Animal procedures

Animals were kept at the Centre for Preclinical studies in sterile filter-top cages and provided with food and water *ad libitum*. Animal procedures were performed according to FELASA guidelines and German animal protection laws and were approved by the Bavarian committee on animal ethics. All mice underwent MR imaging before injection of Resovist or Resovist-labelled cells to establish baseline imaging data. Balb/c-AnN Foxn1^{nu}/Crl mice (nude mice, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) were anaesthetised for MR imaging as described previously [17]. Briefly, anaesthesia was performed by intraperitoneal injection of a combination of 0.5 mg/kg medetomidine (1 mg/mL Domitor; Pfizer, New York, NY, USA), 5 mg/kg midazolam (5 mg/mL, Dormicum; Roche, Vienna, Austria) and 0.05 mg/kg fentanyl (0.05 mg/mL, Fentanyl; Janssen-Cilag, Germany). After MR imaging, different doses of Resovist-labelled CD34⁺ cells were injected into the tail vein of the mice. If paravenous misapplication occurred, mice were excluded from the study. Twelve mice were divided into four experimental groups. The first three groups received 1×10^6 ($n=3$), 5×10^6 ($n=3$) or 1×10^7 ($n=3$) Resovist-labelled human CD34⁺ cells in a total volume of 300 µL HF/2+ medium. In the fourth (control) group ($n=3$), 300 µL 0.9% NaCl solution containing 0.4 µL Resovist was administered. Two and 24 h after injection, mice were anaesthetised again for MR imaging. When studies were completed, the mice were sacrificed.

In vivo MR imaging

Mice underwent imaging before injection as well as 2 and 24 h after injection of Resovist-labelled cells or Resovist at 1.5 Tesla (T) by using a 1.5-T imaging MR scanner (ACS NT; Philips, Best, the Netherlands) and a birdcage volume coil (Medical Advances, Milwaukee, WI, USA), which allows for simultaneous imaging of up to three mice side-by-side. MR pulse sequences included coronal T2*-weighted two-dimensional turbo spin-echo (SE) (repetition time (ms)/echo time (ms) of 3,700/90 with a 90° flip angle and a section thickness of 600 µm) and coronal T2*-weighted three-dimensional fast field-echo sequences (repetition time (ms)/echo time (ms) of 32/14 with a 15° flip angle and a section thickness of 400 µm). MR images were taken with a field of view of 100×80 mm, a 512×512 pixel matrix, and an in-plane spatial resolution of 200×150 µm. As this protocol resulted in good image quality with acceptable signal-to-noise ratios, we decided against single-mouse imaging with a smaller field of view. Our protocol with a slightly larger field of view allows for simultaneous imaging of three mice, thus being time- and cost-efficient and allowing for a higher animal throughput. Signal intensities of three to four operator-defined regions of interest (ROI) in the liver, muscle and bone marrow (femur, spinal cord) were analysed. The minimal size was 20 pixels per region. Signal-

to-noise ratios (SNRs) were calculated by dividing the mean signal intensity of the ROI by the background noise (random fluctuations in signal intensity) [8]. A signal decline was defined as a drop in SNR over time compared with the baseline study. A persistent signal decline was defined as a drop in SNR at 2 h as well as at 24 h after injection.

Histopathological and immunohistochemical analyses

For histopathological analyses, sections of the spinal cord and the femur bone were fixed in 4% neutral buffered formalin, decalcified and embedded in paraffin. Five- μm sections were stained with Prussian blue dye to detect intracellular iron particles followed by eosin counterstaining. For immunostaining, deparaffinised sections were unmasked by boiling in citrate buffer (pH 6.0). After washing in PBS, sections were treated with 0.25% Triton X-100 (Dako, Hamburg, Germany). Then, sections were blocked with 5% normal goat serum and incubated with a 1:100 dilution of a monoclonal fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled antibody directed against the dextran coating of contrast agents (Stem Cell Technologies, Seattle, WA, USA). After a 1-h incubation at room temperature, sections were rinsed three times in PBS, and cell nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (Sigma, Deisenhofen, Germany). Staining was conducted by using anti-human CD34 FITC-labelled antibodies. Sections were analysed by fluorescence microscopy. As controls, paraffin-embedded cell blocks from isolated human 10^6 CD34⁺ cells were prepared to verify iron uptake, and labelling of FITC-stained cells respectively.

Flow cytometry of bone marrow cells

Bone marrow cells were isolated from the tibias and femurs of two non-injected control mice as well as four mice 24 h after the transplantation of 1×10^7 Resovist-labelled human CD34⁺ cells. The bone marrow was triturated using an 18-gauge needle and passed through a 70- μm nylon mesh cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) to make a single cell suspension in DMEM supplemented with 2% FCS and 10 mmol/L Hepes (Invitrogen). Human CD34⁺ cells were detected by flow cytometry by using FITC-labelled antibodies specific to humans CD34 (Beckman Coulter, Germany) as well as a combination of phycoerythrin (PE) antibodies against human CD45 and CD71 (Beckman Coulter). Dead cells were excluded by staining with propidium iodide (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen). Staining specificity was determined by staining with appropriate isotype control antibodies (Beckman Coulter, Germany). Flow cytometric data were analysed by using FlowJo software.

Statistical analysis

We applied a one-way ANOVA to the MR measurements before and 24 h after injection of labelled cells. Analyses

were performed for every tissue to detect differences between the experimental groups at a 5% significance level. When differences were found, we performed pairwise post hoc Student's *t* tests at a Bonferroni corrected two-sided significance level. For statistical computations we used SPSS 16.0 for Windows. Post hoc power calculations were performed with nQuery 7.0 [22].

Results

In vitro labelling of human CD34⁺ cells with SPIO particles

To assess the value of cryopreserved UCB samples, we compared labelling effectiveness, long-term cell survival, and haemopoietic progenitor colony formation of human CD34⁺ cells derived from different UCB sources. Using Prussian blue iron staining and anti-dextran immunostaining, we first determined the uptake of two different SPIO contrast agents, Endorem and Resovist, by CD34⁺ cells that had been derived from either freshly isolated or thawed mononuclear UCB cells. As expected, cellular uptake of Resovist and Endorem was higher in freshly isolated CD34⁺ cells (85% and 83%, respectively) than in thawed cells (49% and 61%, respectively). However, the uptake of Resovist into thawed UCB-derived CD34⁺ cells was sufficient for MR imaging, and no signal decline was observed in unlabelled CD34⁺ cells, thereby excluding an influence of magnetic beads that had been used for isolation of CD34⁺ cells on MR imaging (Fig. 1). We next investigated the effect of labelling on both cell survival and functional capacity. No significant increase in apoptosis was observed in thawed CD34⁺ cells labelled

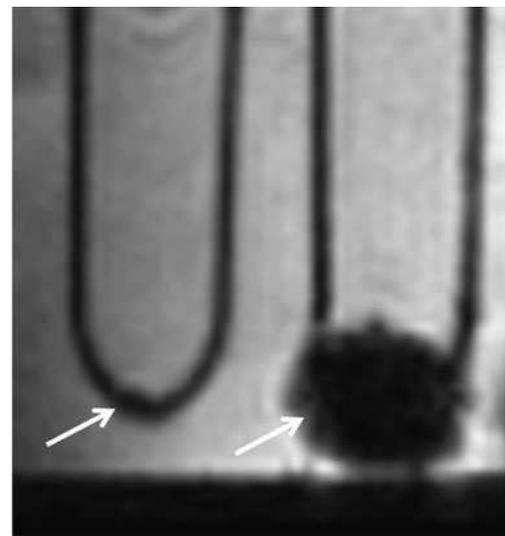


Fig. 1 Representative T2*-weighted MR images of cell pellets (arrows) containing 5×10^6 Resovist-labelled cells (right side) and unlabelled cells (left side) at 1.5 T demonstrate the applicability of Resovist labelling for thawed UCB-derived human CD34⁺ cells. Note that the pellet with unlabelled cells is barely visible, indicating negligible iron content, whereas the pellet with Resovist-labelled cells shows a very strong susceptibility artefact due to the high iron content

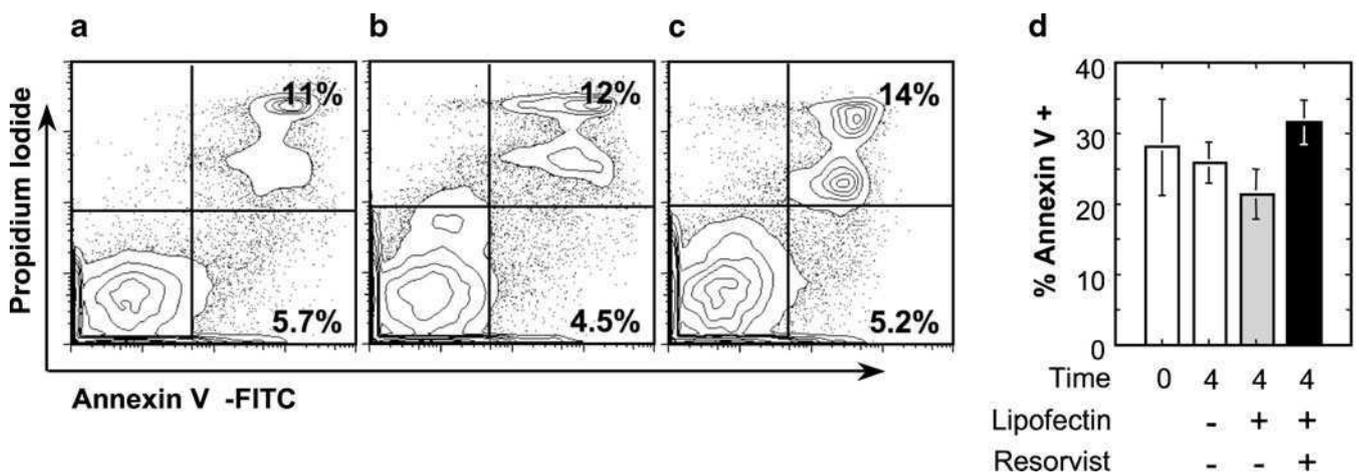


Fig. 2 Labelling of CD34⁺ cells with Lipofectamine or Resovist does not induce apoptosis. UCB-derived CD34⁺ cells were isolated and labelled with Resovist–Lipofectamine complexes as described in the [Materials and methods](#) section. After 4 h under standard cell culture conditions, cells were stained with Annexin V and propidium iodide. The percentages of apoptotic (Annexin V⁺)

CD34⁺ cells after incubation in culture medium without Resovist or lipofectin (a), with lipofectin (b), or with Resovist and Lipofectamine (c) are shown. In a cohort of five replicates, the number of apoptotic cells did not change in any of these treatments (mean ± standard error, $n=5$) (d)

with Resovist (Fig. 2). Importantly, colony assays showed that labelling with Resovist did not reduce the ability of thawed UCB-derived CD34⁺ cells to form haemopoietic colonies (Fig. 3) or to produce cobblestone areas in extended long-term cultures (Fig. 4). Conversely, Endorem reduced haemopoietic progenitor colony formation (Fig. 3). Therefore, we used Resovist for all further experiments.

In vivo MR imaging of SPIO-labelled CD34⁺ cells

T2*-weighted MR imaging of nude mice was performed before and 2 and 24 h after intravenous injection of Resovist-

labelled CD34⁺ cells (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7) or Resovist. Quantitative data for MR signal intensity revealed the differences in body distribution of Resovist and Resovist-labelled cells (Fig. 5). After administration of Resovist, a transient, moderate signal drop in muscle and femur was noted 2 h after injection. However, 24 h after injection, no signal drop was detectable in muscle and femur. As expected, there was a pronounced and persistent signal drop in the liver. After injection of 1×10^6 Resovist-labelled CD34⁺ cells, signal intensity in the liver transiently declined. This decline persisted at higher cell concentrations (5×10^6 , 1×10^7 labelled CD34⁺ cells). In the muscle, no significant changes in signal intensity were observed at any cell

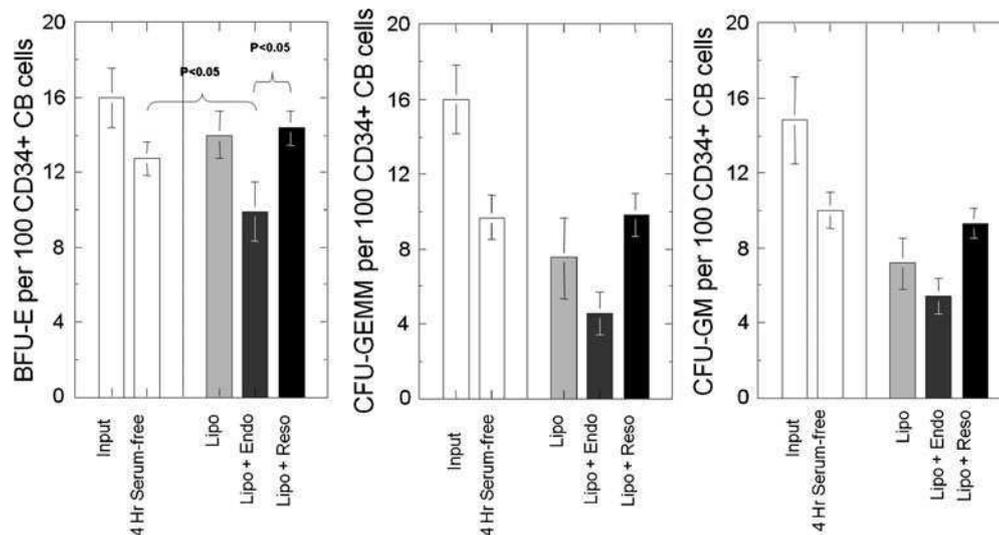


Fig. 3 Effect of Resovist labelling on BFU-E-, CFU-GEMM- and CFU-GM-derived colonies grown by human CD34⁺ cells. Thawed UCB-derived CD34⁺ cells (*Input*) were labelled with Endorem or Resovist (20 µg Fe) or kept in serum-free medium with or without Lipofectamine. Cell differentiation was analysed by using a semi-solid medium assay as described. Results are expressed as the

number of colonies per 100 cells plated; they are the mean ± standard error of five independent experiments. Cells incubated in serum-free medium alone (*4 Hr serum-free*) and after incubation with Lipofectamine (*Lipo*) alone or with Endorem (*Endo*) or Resovist (*Reso*) were compared using a paired Student's *t* test

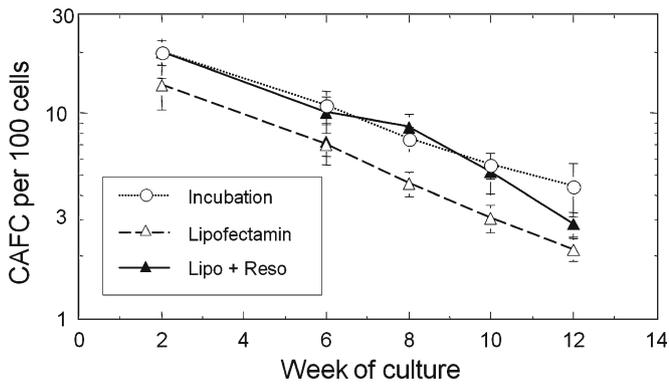


Fig. 4 Frequency of early and late cobblestone area-forming cells (CAFC) of human UCB-derived CD34⁺ cells. Cells incubated with serum-free medium alone (○, incubation), cells treated with Lipofectamine (△, Lipo), and CD34⁺ cells treated with both Lipofectamine and Resovist (▲, Lipo + Reso) were analysed in a limiting dilution assay of CACF with 20 replicates per dilution. Cobblestone areas were counted at early time points (week 2) and late time points (weeks 6, 8, 10 and 12). CACF frequencies were calculated by the L-Calc software (Stem Cell Technologies). Data are presented as mean ± standard error of CAFC per 100 cells plated

concentration. In the bone marrow, there were no significant changes in signal intensity at 1×10^6 Resovist-labelled CD34⁺ cells. At 5×10^6 Resovist-labelled CD34⁺ cells, a moderate and increasing signal drop was notable in the bone marrow, which, however, did not reach statistical significance. However, compared with Resovist, 1×10^7 Resovist-labelled CD34⁺ cells caused a significant and persistent signal decrease in the bone marrow of both femur (−9.0, 95% CI −3.5 to −14.6, $p=0.003$) and sacrum bone (−8.6, 95% CI −3.1 to −14.2, $p=0.004$; data not shown). Whole body in vivo MR images of mice transplanted with 1×10^7 Resovist-labelled CD34⁺ cells show the signal intensity decline in liver and femur 24 h after transplantation (Fig. 6). Corresponding magnification of femur demon-

strate the cell dose- and time-dependent signal intensity decline at 2 and 24 h after transplantation of 1×10^6 , 5×10^6 and 1×10^7 labelled CD34⁺ cells (Fig. 7). These results indicate that Resovist-labelled CD34⁺ cells accumulate in the bone marrow of transplanted mice within 24 h, and, moreover, that this accumulation can be monitored in vivo by MR imaging with a detection threshold of 1×10^7 Resovist-labelled CD34⁺ cells per injection.

Histological analysis of bone marrow sections

To confirm the presence of Resovist-labelled CD34⁺ human cells in the bone marrow of recipient mice, we re-isolated cells by fluorescence-activated cell sorting (FACS) sorting, and isolated cells were characterised by triple staining for human CD45, CD71 and CD34. These experiments demonstrated that, 24 h after transplantation, the bone marrow contained about 0.08% human cells (Fig. 8a–c). Conversely, in control mice that had received no cell injections, these anti-human antibodies did not show reactivity. A frequency of 0.08% human cells in a total of 6×10^8 harvested cells means we detected an estimated 5×10^4 human cells in the tibia and femur (two long bones). The carboxydextran coat of Resovist particles was visualised by fluorescence immunostaining microscopy, demonstrating that all sorted human cells were Resovist-labelled, albeit the level of labelling was variable (Fig. 8e). Prussian blue staining of murine femoral bone marrow demonstrated iron-positive cells 24 h after transplantation of 1×10^7 Resovist-labelled human CD34⁺ cells, whereas no staining was observed in control mice that had received Resovist (Fig. 8d,f). Moreover, the carboxydextran coat of Resovist particles was detected in the femoral bone marrow 24 h after transplantation of 1×10^7 Resovist-labelled human CD34⁺

i.v. injection of Resovist and SPIO labeled CD34⁺ cells

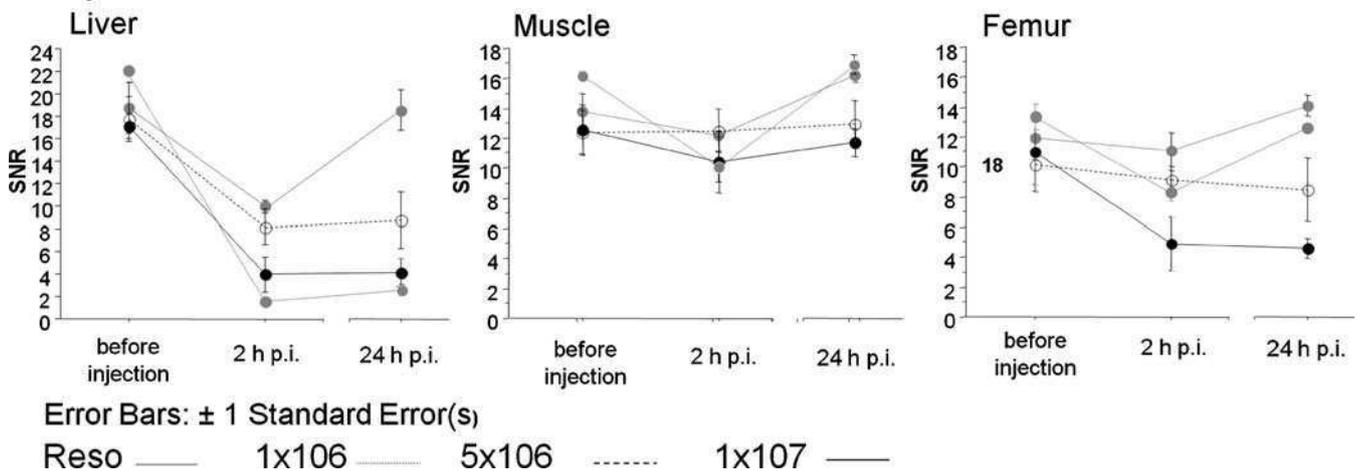


Fig. 5 Quantitative data for MR signal intensity of murine liver, muscle and bone marrow (femur) before and 2 and 24 h after intravenous administration of Resovist (control) or Resovist-labelled UCB-derived human CD34⁺ cells. SNRs are displayed as means ± standard errors for two mice in the control group. In the

experimental group, mice received 1×10^6 , 5×10^6 or 1×10^7 SPIO-labelled cells ($n=3$). Compared with Resovist, 1×10^7 Resovist-labelled cells cause a significant MR signal decline in the femur after 24 h

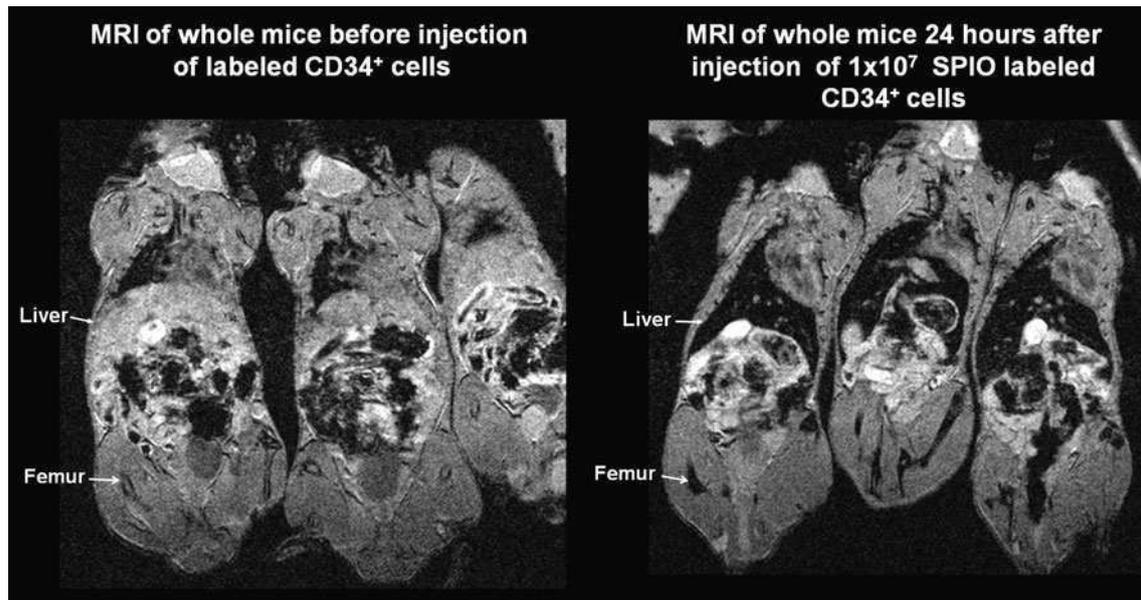


Fig. 6 In vivo T2*-weighted 1.5-T MR images of mice before and 24 hours after transplantation of 1×10^7 Resovist-labelled CD34⁺ cells (three different mice each group). Transplantation of Resovist-labelled

cells caused a marked signal intensity decline in liver and bone marrow of the femur (white arrows)

cells (Fig. 8g). Taken together, these results imply that the decline in MR signal intensities observed in the bone marrow of transplanted mice was indeed caused by Resovist-labelled human cells.

Discussion

In this study, we demonstrated that homing of intravenously injected human CD34⁺ cells to the bone marrow of athymic mice can be non-invasively monitored by MR imaging using clinical 1.5-T equipment.

Since CD34⁺ cells were poorly labelled by existing protocols [12, 17, 18], we optimized the existing labelling protocol to include Lipofectamine. Our data demonstrate that CD34⁺ cells derived from thawed UCB samples are effectively labelled with SPIO by using Resovist and lipofection. SPIO labelling with Resovist does not impair long-term cell viability or multilineage differentiation in vitro. We further demonstrated that MR imaging is able to consistently demonstrate the homing of Resovist-labelled CD34⁺ cells to the bone marrow of the femur and sacrum 24 h after intravenous injection of 1×10^7 CD34⁺ cells.

Two previous studies evaluated the in vivo distribution of intravenously administered iron oxide-labelled haemopoietic progenitor cells [17, 18]; however, the one study did not look into in situ tracking [18], and the other did not look at CD34⁺ progenitors in vivo [17]. Our study shows that it is feasible to track purified CD34⁺ cells in live mice by whole body MR imaging. Moreover, we observed no toxicity induced by injection of this number

of labelled cells. With a detection threshold of 1×10^7 CD34⁺ cells per intravenous injection, the accumulation of transplanted cells in the bone marrow of athymic mice could be monitored by using clinical MR equipment. It has been demonstrated recently that the combination of iron oxide particles with molecular imaging techniques enables the in situ detection of 4×10^5 transplanted CD34⁺ human cells in the bones of recipient mice with no detectable cell toxicity in vivo. In live animals, however, MR imaging of the bone marrow failed at this cell number [18]. In attempts to solve the limits of imaging small cell numbers, several in vivo studies on haemopoietic stem cell homing have been performed by using genetic labels, radionuclides or membrane dyes [23]. However, contrary to our present study, these techniques have been reported to encompass limitations such as the risk of phenotype alterations of the target cells or toxicity [24]. Other imaging techniques such as single photon emission computed tomography or positron emission tomography (PET) have been shown to provide higher sensitivity but poorer spatial resolution than MR imaging [25].

Recent work showed that nanoparticle-labelled CD34⁺ human stem cells can be increasingly detected in the bone marrow of recipient mice within 2 weeks of transplantation [18]. Therefore, this accumulation might result in more pronounced changes in MR signal intensities at later time points than we examined. Yet such effects should be interpreted with caution, as internalised iron oxide particles might be subsequently metabolised, distributed between dividing cells or released by dying cells over time [17]. In our study, no extracellular iron oxide deposits were detected in the bone marrow of recipient mice, suggesting that iron particles are not released in the bone marrow of recipient

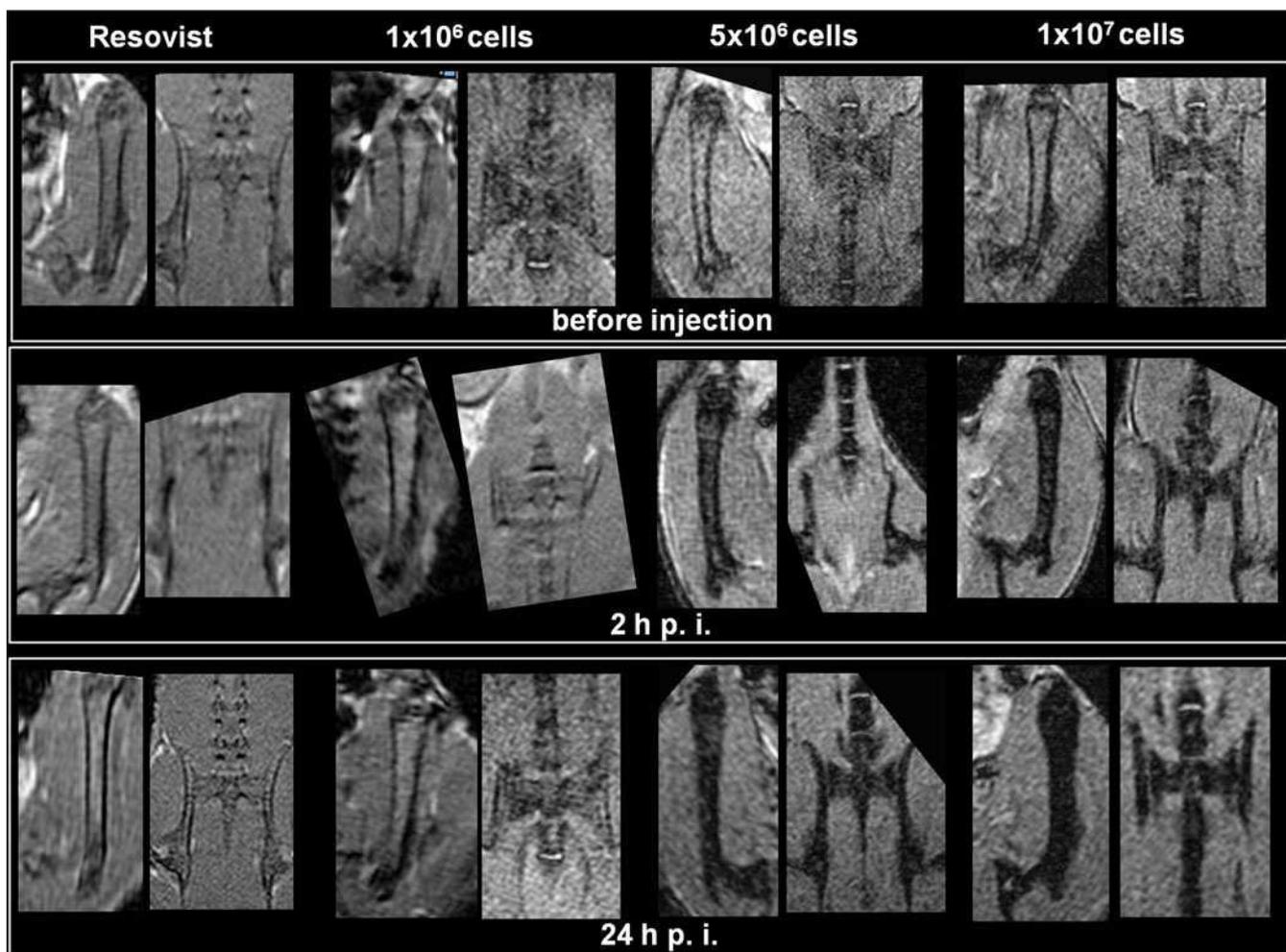


Fig. 7 Magnification of in vivo T2*-weighted 1.5-T MR images of murine femur and sacrum bone. From left to right, MR images correspond to mice that received Resovist or 1×10^6 , 5×10^6 and 1×10^7 Resovist-labelled CD34⁺ cells. MR images were obtained

before (upper row) or 2 h (middle row) and 24 h (lower row) after transplantation. Magnification of murine femurs and sacrum illustrates the cell dose- and time-dependent signal intensity decline in the bone marrow

mice. This view is strengthened by the intracellular localisation of iron oxide particles and the presence of dextran-positive cells within the bone marrow, which indicates the stable label retention of Resovist in transplanted cells within the time of observation. However, as mouse phagocytic cells would easily uptake iron oxide particles released from transplanted cells, one might speculate that the observed changes in MR signal intensities are caused by Resovist-containing murine cells. Concerning the biodistribution of Resovist-labelled cells outside the bone marrow, we noticed a cell dose-dependent signal drop in the liver and spleen after administration of labelled cells. This finding agrees with previous results that also show the accumulation of labelled cells in liver and spleen. We hypothesize that a certain amount of Resovist-labelled cells is taken up by the reticuloendothelial system (RES), which might therefore impair the amount of cells reaching the bone marrow. Moreover, a transient signal decline in muscle tissue was caused by Resovist and to a lesser extent by Resovist-

labelled cells. Resovist also induced a transient signal drop in bone marrow. This might be caused by an unspecific blood-pool effect of some amount of contrast agent which is still circulating at 2 h after intravenous administration but is subsequently removed from the blood pool at 24 h after injection.

There were several limitations in our study. First, the low number of mice used for experiments reduces the statistical relevance of our assessments. However, our study primarily intended both to demonstrate the feasibility of stem cell tracking by MR imaging and to examine the minimum cell number required. Due to the small sample size we only performed ANOVA on the difference between 0 and 24 h followed by pairwise post hoc tests. However, further studies with a higher number of animals are now planned to enhance the validity of our results. Second, the detection threshold amounted to 10^7 transplanted cells. Although we did not determine the iron content of labelled cells, we hypothesize that the iron

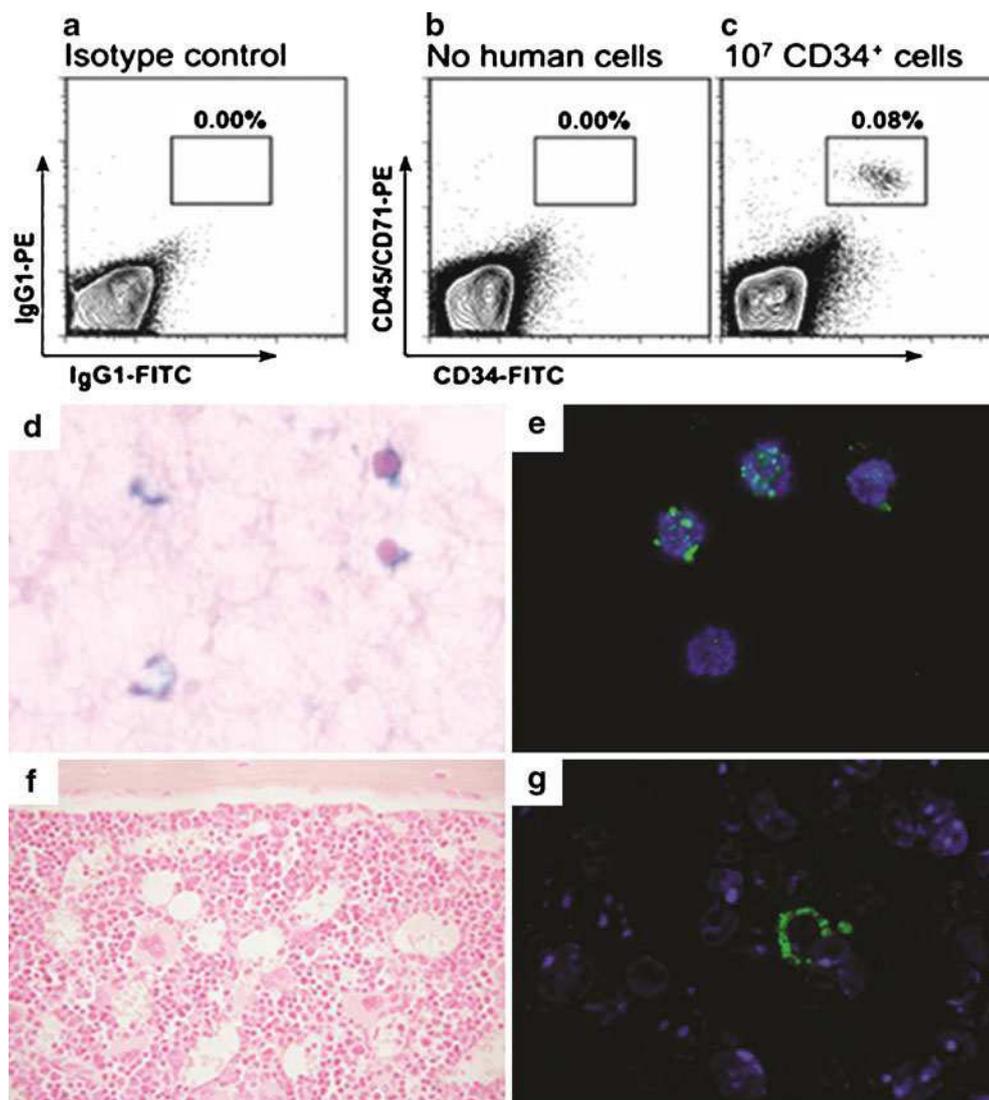


Fig. 8 Detection of Resovist-labelled human cells. Transplanted cells were re-isolated from the bone marrow of recipient mice by using cell sorting. Single cell suspensions of tibias and femurs obtained from two control mice (**b**) or two mice 24 h after transplantation of 1×10^7 SPIO-labelled human CD34⁺ cells (**c**) were stained with FITC- or PE-conjugated isotype-matched control antibodies (**a**). Single cell suspensions of mice that were not transplanted (**b**), or were transplanted with 1×10^7 Resovist-labelled CD34⁺ cells (**c**), were labelled with antibodies against phycoerythrin (PE)-labelled anti-CD45, CD71 and Fluorescein (FITC)-labelled anti-CD34 antibodies as described in the [Materials and methods](#) section. Flow cytometric data were analysed by using FlowJo software. Resovist-labelled cells were detected by Prussian blue staining for iron (**d**, **f**) and

immunostaining for the carboxydextran-coat of Resovist particles (**e**, **g**). Prussian blue staining of murine femoral bone marrow reveals the presence of transplanted cells 24 h after intravenous administration of 1×10^7 Resovist-labelled human CD34⁺ cells (**d**; magnification $\times 400$). Conversely, no staining was observed in control mice that received Resovist (**f**; magnification $\times 300$). The carboxydextran coat of Resovist particles was immunologically detected (*green fluorescence*) both in isolated Resovist-labelled CD34⁺ cells (**e**) and in the femoral bone marrow 24 h after transplantation of 1×10^7 Resovist-labelled human CD34⁺ cells (**g**). The *blue structures* are DAPI-stained nuclei (magnification $\times 400$). Each picture is representative for three animals

content per cell in our study is comparable to that of previously reported studies that measured 2.01 ± 0.1 pg per CD34⁺ cell [26]. To gain even higher sensitivity, the signal-to-noise ratio could be increased by MR imaging at 9.4 Tesla. Alternatively, the required cell number could be reduced by local administration of labelled cells as demonstrated recently [27]. The development of these

methodologies for the in vivo detection of functional haemopoietic stem cells as well as the exact determination of cellular iron content will be a challenge in future studies. Third, because Resovist-labelled cells also accumulate in liver and spleen [17], a detailed analysis is still required to evaluate the amount of transplanted cells retained in these organs.

Conclusion

In summary, this study demonstrates that Resovist labeling of purified CD34⁺ UCB-derived cells does not impair cellular functionality and that migration of these cells to the bone marrow after intravenous injection can be measured by using non-invasive clinical 1.5-T MR

imaging technology. Further optimisation of this technique might allow us to monitor labelled cells in patients during cell-based therapies for various malignant and non-malignant disorders.

Acknowledgements This work was supported by internal clinical funding from the Technische Universität München (KKF 08-04).

References

- Kondo M, Wagers AJ, Manz MG et al (2003) Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 21:759–806
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105–111
- Bradley MB, Cairo MS (2005) Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Hum Immunol* 66:431–446
- Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ et al (2007) Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet* 369:1947–1954
- Civin CI, Trischmann T, Kadan NS et al (1996) Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 14:2224–2233
- Wagner JE, Barker JN, DeFor TE et al (2002) Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 100:1611–1618
- Elmaagacli AH, Peceny R, Steckel N et al (2003) Outcome of transplantation of highly purified peripheral blood CD34⁺ cells with T-cell add-back compared with unmanipulated bone marrow or peripheral blood stem cells from HLA-identical sibling donors in patients with first chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 101:446–453
- Lanzkron SM, Collector MI, Sharkis SJ (1999) Hematopoietic stem cell tracking in vivo: a comparison of short-term and long-term repopulating cells. *Blood* 93:1916–1921
- Strauer BE, Kornowski R (2003) Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 107:929–934
- Barkhausen J, Quick HH, Lauenstein T et al (2001) Whole-body MR imaging in 30 seconds with real-time true FISP and a continuously rolling table platform: feasibility study. *Radiology* 220:252–256
- Choi S, Tang XW, Cory DG (1997) Constant time imaging approaches to NMR microscopy. *Int J Imaging Syst Technol* 8:263–276
- Daldrup-Link HE, Rudelius M, Oostendorp RA et al (2003) Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology* 228:760–767
- Rudelius M, drup-Link HE, Heinzmann U et al (2003) Highly efficient paramagnetic labelling of embryonic and neuronal stem cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:1038–1044
- Arbab AS, Yocum GT, Wilson LB et al (2004) Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability. *Mol Imaging* 3:24–32
- Frank JA, Miller BR, Arbab AS et al (2003) Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* 228:480–487
- Frank JA, Anderson SA, Kalsih H et al (2004) Methods for magnetically labeling stem and other cells for detection by in vivo magnetic resonance imaging. *Cytotherapy* 6:621–625
- Daldrup-Link HE, Rudelius M, Piontek G et al (2005) Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model: in vivo monitoring with 1.5-T MR imaging equipment. *Radiology* 234:197–205
- Maxwell DJ, Bonde J, Hess DA et al (2008) Fluorophore-conjugated iron oxide nanoparticle labeling and analysis of engrafting human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 26:517–524
- Ahmed F, Ings SJ, Pizzey AR et al (2004) Impaired bone marrow homing of cytokine-activated CD34⁺ cells in the NOD/SCID model. *Blood* 103:2079–2087
- Oostendorp RA, Gilfillan S, Parmar A et al (2008) Oncostatin M-mediated regulation of KIT-ligand-induced extracellular signal-regulated kinase signaling maintains hematopoietic repopulating activity of Lin-CD34⁺CD133⁺ cord blood cells. *Stem Cells* 26:2164–2172
- Breems DA, Blokland EA, Neben S et al (1994) Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. *Leukemia* 8:1095–1104
- O'Brien RG, Muller KE (1993) Unified power analysis for t-tests through multivariate hypotheses. In: *Applied analysis of variance in behavioral science*. Marcel Dekker, New York, pp 297–344
- Bonde J, Hess DA, Nolte JA (2004) Recent advances in hematopoietic stem cell biology. *Curr Opin Hematol* 11:392–398
- Hacein-Bey-Abina S, Von KC, Schmidt M et al (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348:255–256
- Gillies RJ (2002) In vivo molecular imaging. *J Cell Biochem Suppl* 39:231–238
- Arbab AS, Yocum GT, Kalish H et al (2004) Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 104:1217–1223
- Arbab AS, Janic B, Knight RA et al (2008) Detection of migration of locally implanted AC133⁺ stem cells by cellular magnetic resonance imaging with histological findings. *FASEB J* 22:3234–3246

7.3. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peschel danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Doktorarbeit.

Ich danke vor allem Herrn PD Dr. Oostendorp für seine fachliche Betreuung und seine Anregungen zu neuen Versuchsansätzen. Er ermöglichte mir ein flexibles und eigenständiges Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Hippauf und Frau März für ihre technische Unterstützung. Frau Hippauf danke ich für die Hilfe beim Einarbeiten und für die Einführung in die grosse Welt des Mikroskopierens.

Herzlichen Dank sage ich meiner Familie und meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihr Verständnis, ihre Geduld und ihren Rückhalt.

7.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Disseration wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Ansbach, den 05.05. 2011

Viktoria Bekker