Aus der Medizinischen Klinik III der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Untersuchungen zur Kryokonservierung hämatopoetischer Stammzellen aus menschlichem Knochenmark mit Trehalose

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Christine Scheinkönig
aus
München
2005

Aus der Medizinischen Klinik III der
Ludwig-Maximilian-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Untersuchungen zur Kryokonservierung hämatopoetischer Stammzellen aus menschlichem Knochenmark mit Trehalose

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christine Scheinkönig
aus
München
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Schleuning

Mitberichterstatter: Prof. Dr. S. Nees
Prof. Dr. B. Emmerich

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Susanne Kappicht

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2005

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung *7*

2. Zielsetzung *8*

2.1 Kryoprotektive Eigenschaften von Trehalose **8**

2.2 Hinweise auf die Verträglichkeit von Trehalose **8**

3. Stand der Wissenschaft *9*

3.1 Hämatopoese **9**

3.1.1 Hämatopoese in verschiedenen Entwicklungsstadien 9

3.1.2 Rolle des Stromas 9

3.2 Theorien über das Vorhandensein von hämatopoetischen Stammzellen **10**

3.3 Langzeitkultur **11**

3.3.1 verschiedene Verfahren 11

3.3.2 Feeder – Layer 12

3.4 Konservierung von hämatopoetischen Zellen **12**

3.4.1 Indikationen 12

3.4.2 Kühlung 13

3.4.3 Probleme beim Einfrieren und Auftauen 14

3.4.4 Wirkungsmechanismen von Einfriermedien 15

3.4.5 Trehalose 16

3.4.6 Dimethylsulfoxid (DMSO) 17

4. Eigene Untersuchungen *20*

4.1 Material **20**

4.1.1 Knochenmark 20

4.1.2 Zellkulturmedien und Waschlösungen 21

4.1.3 Zusätze 22

4.1.4 Einfriermedien 22

4.1.5 Antikoagulantien 22

4.1.6 Sonstige Reagenzien 22

4.1.7 Zellkulturgefäße 23

4.1.8 Pipetten und Zubehör 23

4.1.9 Pipettiergefäße 23

4.1.10 Geräte 23

4.2 Methoden **24**

4.2.1 Langzeitkultur 24
4.2.2 Radioimmunassay 35

4.3 Ergebnisse 37
4.3.1 Feeder-Layer 37
4.3.2 Vergleich DMSO – Trehalose in der LTC 50
4.3.3 Radioimmunassay zur Bestimmung der C3a Konzentration in mit DMSO bzw. mit Trehalose gefrorenen Knochenmarksproben 52

5. Diskussion 54

5.1 Kryoprotektive Eigenschaften von Trehalose 54

5.2 Langzeitkultur von kryokonservierten Knochenmarkzellen 56

5.3 Komplementaktivierung in mit Trehalose oder DMSO inkubiertem oder gefrorenem Knochenmark 56

5.4 Offene Fragen 57

6. Zusammenfassung 58

7. Literaturverzeichnis 59

8. Abkürzungsverzeichnis 64

9. Danksagung 65

10. Lebenslauf der Verfasserin 66

1. Einleitung

Zellen und / oder Lebewesen durch Tiefkühlung zu konservieren, ohne sie funktionell zu beeinträchtigen, ist nicht nur ein uralter Menschheitstraum, sondern auch von immenser Bedeutung für zelluläre Therapieansätze in der modernen Medizin.

Pioniere auf diesem Gebiet waren Reaumur und Spalanzani, die Experimente z.B. mit Insekten und mit Spermazellen verschiedener Tierarten unternahmen. Ihre Untersuchungen (1736, 1787), wie auch alle folgenden brachten jedoch nur enttäuschende Ergebnisse, bis es erstmals Pole, Smith und Parkes (1949) gelang, Rinder - Spermatozoen tiefzukühlen, ohne sie zu zerstören. Sie verwendeten in ihrem Verfahren Glycerol, das daher als das erste Frostschutzmittel für lebende Zellen bezeichnet werden kann (Gorin 1992).

Wenige Jahre später zeigten Barnes und Loutit, dass es möglich war, mit dem von Pole, Smith und Parkes etablierten Verfahren auch Knochenmark erfolgreich zu kryokonservieren (English 2001, Gorin 1992).

Seitdem wurden rasche Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt.
1959 entdeckten Lovelock und Bishop das Frostschutz – Potential von Dimethylsulfoxid (DMSO) für lebende Zellen und legten damit den Grundstock für die autologe Knochenmarktransplantation, wie sie heute praktiziert wird (s. 2.4.1.).
Nur wenig später, im Jahre 1962, veröffentlichten Calvins et al ihre Ergebnisse über die ersten erfolgreichen autologen Knochenmarktransplantationen bei letal bestrahlten Hunden mit DMSO kryokonserviertem Knochenmark (Gorin 1992).

Trotz erheblicher Nebenwirkungen, wie beispielsweise Kopfschmerzen, Erbrechen und Hämoglobinurie bis hin zum akuten Nierenversagen und Schockzustand ist DMSO mangels einer gleichwertigen Alternativsubstanz bis heute das Standardgefrierschutzmittel bei der Kryokonservierung von Knochenmarkzellen (Kappicht 1999, Okamoto 1993, Styler 1992, Stroncek 1991, Rapoport 1991, Kessinger 1990, Davis 1990, Smith 1987).

Die folgende Arbeit soll dazu betragen, eine potentiell verträglichere Alternative zu DMSO zu finden und so die Knochenmarktransplantation mit kryokonservierten hämatopoetischen Stammzellen für den Patienten komplikationsärmer zu gestalten.

2. Zielsetzung

2.1 Kryoprotektive Eigenschaften von Trehalose

Ein Ziel der Arbeit war es, die kryoprotektiven Eigenschaften von Trehalose, einem Disaccharid, an hämatopoetischen Stammzellen zu untersuchen, um so die Eignung von Trehalose als potentiell besser verträgliche Alternative zu DMSO zu überprüfen.

Für das Engraftment nach Knochenmark-Transplantationen ist es unabdingbar, dass im Transplantat vitale hämatopoetische Stammzellen, die das Potential zur Selbsterneuerung besitzten, in ausreichender Zahl vorhanden sind (Dounay 1982).
In vitro kann man das Vorhandensein dieser hämatopoetischen Stammzellen am zuverlässigsten mit Hilfe der sogenannten Langzeitkultur überprüfen. Dabei wird davon ausgegangen, dass sehr frühe Vorläuferzellen der Hämatopoese gleichbedeutend sind mit der sogenannten „longterm culture initiating cell“ (LTC-IC), einer Zelle, die auch nach 5-wöchiger Kultivierung noch teilungs- und differenzierungsfähig ist, also im anschließenden Methylzellulose-Assay Kolonien bilden kann (Winton 1987).
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher folgende Problemstellungen bearbeitet:

a) Nachdem für Langzeitkulturen (LTC) mit Trehalose-kryokonserviertem Knochenmark keine Erfahrungen vorlagen, musste zunächst eine geeignete Methodik erarbeitet werden.

b) Daneben musste untersucht werden, welche Trehalose-Konzentration Knochenmarkzellen beim Einfrieren und Auftauen am besten schützt.

c) Unter der Hypothese, daß Insulin die Aufnahme von Trehalose in die Zellen verbessern könnte, sollte untersucht werden, ob der Zusatz von Insulin zu Trehalose das kryoprotektive Potential erhöhen könnte.

d) Schließlich sollte, aufbauend auf den in o.g. Versuchen gewonnenen Ergebnissen, Trehalose- und DMSO-kryokonserviertes Knochenmark in der Langzeitkultur verglichen werden.

2.2 Hinweise auf die Verträglichkeit von Trehalose

Messungen der Konzentration des Anaphylatoxins C3a zeigten, daß das Auftreten von Nebenwirkungen nach Knochenmark-Transplantationen mit DMSO-kryokonserviertem Knochenmark mit der Konzentration von Anaphylatoxinen im Transplantat und mit der Intensität der Komplementaktivierung in vivo während und nach der Infusion korreliert. (Kappicht 2000).

Deshalb sollte Trehalose-kryokonserviertes Knochenmark auf eine eventuelle Komplementaktivierung hin untersucht werden. Hierzu wurde die Konzentration des Anaphylatoxins C3a im Radioimmunoassay bestimmt.

3. Stand der Wissenschaft

3.1 Hämatopoese

3.1.1 Hämatopoese in verschiedenen Entwicklungsstadien

Beim Fötus findet die Hämatopoese zunächst in der Leber und Milzanlage statt, später im primären Knochenmark. In den ersten Lebensmonaten ist das gesamte Knochenmark rotes, das heißt blutbildendes Knochenmark. Mit fortschreitendem Alter wandelt sich das rote Knochenmark zunehmend in gelbes Fettmark um, so dass etwa vom zehnten Lebensjahr an ungefähr gleich viel rotes wie gelbes Knochenmark vorhanden ist.
Beim Jugendlichen und beim Erwachsenen befindet sich das rote, blutbildende Knochenmark v.a. in den überwiegend spongiösen Knochen des Rumpfes, wie Wirbeln, Rippen, Brust- und Darmbein und in den Schädelknochen. In den Röhrenknochen, besonders in den Diaphysen findet sich dagegen in der Hauptsache gelbes Fettmark (Bucher 1992).
Unter normalen Umständen produziert das rote Knochenmark eines Menschen pro Tag ca. 200 bis 250 Milliarden rote und etwa 15 Milliarden weiße Blutzellen, sowie etwa 500 Milliarden Thrombozyten.
Ist auf Grund einer besonderen, in der Regel pathologischen Situation eine deutlich vermehrte Blutbildung von Nöten, so wandelt sich gelbes Fettmark wieder in rotes blutbildendes Knochenmark um. Unter bestimmten Umständen kann auch wieder eine extramedulläre Blutbildung erfolgen. Stammzellen können das Knochenmark verlassen und durch bisher unbekannte Mechanismen andere Organe, wie z.B. die Milz, als Matrix nutzen (Bedi 1995, Bucher 1992).
Auf ca. 2×10^4 kernhaltige Knochenmark-Zellen kommt eine pluripotente Stammzelle (Sutherland 1990).

3.1.2 Rolle des Stromas

Im blutbildenden Knochenmark befinden sich neben hämatopoetischen Zellen jeglichen Reifegrades auch Zellen, die das sogenannte Knochenmarkstroma bilden (Bedi 1995, Eaves 1991). Es gibt unterschiedliche Theorien, ob und inwieweit diese Stromazellen auf die Hämatopoese einwirken:
Das stochastische Modell geht davon aus, dass multipotente hämatopoetische Zellen zufällig und durch in ihnen selbst festgelegte Faktoren in die eine oder andere Richtung ausdifferenzieren. Stromazellen und andere externe Faktoren hätten demnach keinen Einfluß auf die Differenzierungsrichtung.
Das induktive Modell dagegen nimmt an, dass externe Stimuli, wie beispielsweise das durch Stromazellen erzeugte Mikroenvironment mit seinen Wachtumsfaktoren, durch Steuerung der Gentranskription die Differenzierung auslösen und ihre Richtung bestimmen.
Diese Modelle zu überprüfen ist schwierig, da das Überleben von hämopoetischen Zellen in vitro abhängig ist von einer Matrix, die eben das von Stromazellen erzeugte Mikroenvironment mit seinen Wachstumsfaktoren darstellt. Die potentielle Fähigkeit hämatopoetischer Zellen ohne externe Stimuli auszudifferenzieren konnte daher nur mittels eines Artefakts untersucht werden: In eine multipotente hämatopoetische Zelllinie wurde ein

bcl-2 Gen eingeschleust und so die Apoptosefähigkeit der Zellen ausgeschaltet. Diese Zellen konnten auch unter wachtumsfaktorfreien Kulturbedingungen in alle drei Zelllinien ausdifferenzieren.
Diese Untersuchungen sind vereinbar mit der These, dass externe Faktoren für eine Ausdifferenzierung von hämatopoetischen Zellen nicht nötig sind, jedoch die Differenzierungsrichtung beeinflussen (Bedi 1995).
Für das Überleben und die Selbsterneuerung von frühen hämatopoetischen Zellen sind Wachtumsfaktorn und somit das durch Stromazellen erzeugte Mikroenvironment jedoch essentiell (Eaves 1991, Coutinho, Bedi 1995).

3.2 Theorien über das Vorhandensein von hämatopoetischen Stammzellen

Bereits 1920 postulierte Maximow die Idee einer pluripotenten Stammzelle. Es sollte jedoch Jahrzehnte dauern, bis diese Idee sich in der Wissenschaft durchsetzte. Man ging lange von einem Myeloblasten als Stammzelle für die im Knochenmark gebildeten und einem Lymphoblasten als Stammzelle für die im lymphatischen System gebildeten Zellen aus. Auch die Existenz eines Monoblasten als Stammzelle der Monozyten wurde diskutiert (Bucher 1992).
Die Diskussion um die Existenz einer pluripotenten Blutstammzelle ist verständlich, da es nicht möglich war, diese Stammzelle direkt mikroskopisch nachzuweisen. Pluripotente Stammzellen und andere frühe Vorläuferzellen der Hämatopoese sind morphologisch nicht unterscheidbar (Bucher 1992, Winton 1987). Selbst moderne Methoden, wie z.B. die fluorometrische Analyse von Oberflächenproteinen sind nicht in der Lage die hämatopoetische Stammzelle eindeutig zu definieren.
Es besteht jedoch die Möglichkeit, die Stammzelle indirekt funktionell nachzuweisen. Zwei Charakteristika einer pluripotenten Stammzelle sind ihre Selbsterneuerungsfähigkeit und ihre Pluripotenz, d.h. dass sie nach einem unbegrenzt langem Zeitraum noch teilungs- und differenzierungsfähige Zellen hervorbringen kann. Im Gegensatz dazu differenzieren frühe Vorläuferzellen der Hämatopoese, die bereits eine Differenzierungsrichtung eingeschlagen haben, schließlich aus und sind dann nicht mehr fähig sich selbst zu erneuern und haben somit die Qualität einer hämatopoetischen Stammzelle verloren.
Frühe Vorläuferzellen der Hämatopoese können in Methylzellulosekulturen Kolonien bilden. Man nennt sie deshalb auch colony forming units, oder kurz CFU´s. Da frühe Vorläuferzellen jedoch das Potential zur Selbsterneuerung verloren haben, sind sie in Kultur nur wenige Wochen überlebensfähig.
Wenn also aus einer Zellkultur nach langer Zeit immer noch CFU´s angezüchtet werden können, so muß in dieser Zellkultur eine Zelle existieren, die ein entsprechendes Selbsterneuerungspotential besitzt, um auch nach mehreren Wochen Kultur differenzierungsfähige Zellen zu generieren, die dann im Methylzelluloseassay Kolonien bilden.
Diese Ausgangszelle nennt man beschreibend long-term-culture-initiating-cell, kurz LTCIC und setzt sie mit der gesuchten Stammzelle gleich (Eaves 1991).
Nach Eaves (1991) müssen nach 5 Wochen in Kultur im anschließenden Methylzellulose-Assay noch CFU´s nachgewiesen werden können, um von der Existenz einer LTCIC sprechen zu können.

Klinisch wesentlich ist, daß die LTCIC eine Zelle ist, die bei einer Knochenmarktransplantation im Empfänger langfristig zur Blutbildung befähigt ist (Coutinho). Eine ausreichende Anzahl an LTCIC´s im Spenderknochenmark ist also Vorausetzung für eine erfolgreiche Transplantation (Douay 1982).

3.3 Langzeitkultur

Die einzige zuverlässige Möglichkeit, eine LTC-IC, die man mit der hämatopoetischen Stammzelle gleichsetzt, in vitro nachzuweisen, ist die Langzeitkultur (long – term – culture, LTC). Hier muß die Zelle mindestens 5 Wochen lang kultiviert werden, um danach auf ihre Klonogenität getestet zu werden (Eaves 1991). Wie oben schon angesprochen (3.1.2.), brauchen Stammzellen spezielle Kulturbedingungen, um in vitro überleben zu können. Hierzu gehört neben einem geeigneten Nährmedium eine Schicht aus Knochenmark - Stromazellen, die das für das Überleben der Stammzellen nötige Microenvironment schaffen. Die verschiedenen Komponenten des Microenvironmentes sind bisher noch kaum verstanden, ihre Bedeutung für das Überleben der hämatopoetischen Stammzellen jedoch unumstritten (Eaves 1991, Dexter 1980, Sutherland 1991).

3.3.1 verschiedene Verfahren

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, geeignete Kulturbedingungen für LTC-ICs zu schaffen. Neben einer Auswahl an erprobten Kulturmedien (Eaves 1991, Pettengell 1994, Bertolini 1996, Berardi 1995, Udomsaki 1992, Coulombel 1983, Dooley 1992) gibt es auch mehrere Verfahren die Stromazellschicht, die das Mikroenvironment erzeugt, zu etablieren. Diese Stromazellschicht in der LTC nennt man anschaulich den „Feeder – Layer“.

Ein – Schritt Verfahren:

In nicht weiter verarbeitetem Knochenmark existieren neben hämatopoetischen Zellen und reifen Blutzellen auch die Stromazellen. Diese Stromazellen bilden in geeignetem Medium in mit Gelatine beschichteten Zellkulturgefäßen eine adhärente Schicht, den sogenannten Feeder – Layer. Die Ausbildung dieser Schicht dauert bei 37°C, 5% CO2 und ca. wöchentlichem Mediumwechsel etwa zwei Wochen (Coutinho). Die nicht – adhärenten Zellen setzten sich anfangs aus hämatopoetischen Zellen und reifen Blutzellen zusammen. Im Lauf der Zeit sterben die reifen Blutzellen ab, während die hämatopoetischen Zellen auf und auch in ihrem Feeder – Layer und unterstützt von einem LTC – Medium überleben, sich vermehren und differenzieren. Auch der Feeder – Layer selbst wächst weiter und wird immer dicker, was schließlich dazu führen kann, dass er sich vom Untergrund ablöst (Eaves 1991) und damit ist das weitere Gedeihen der Kultur gefährdet.

Nach 5 Wochen Zellkultur werden die Zellen der adhärenten und nicht – adhärenten Fraktion zusammen oder getrennt in Methylzellulose eingebracht und bei 37°C und 5% CO2 inkubiert. Die Klonogenität der eingebrachten Zellen kann nach 2 Wochen an den entstandenen CFU´s abgelesen werden (Eaves 1991).

Zwei – Schritt Verfahren:

Es gibt auch die Möglichkeit, einen Feeder – Layer zu etablieren und ihn, sobald er konfluent ist, mit 15-16 Gray zu bestrahlen (Pettengell 1994, Sutherland 1989). Durch diese Bestrahlung wird die Teilungsfähigkeit aller

Zellen außer Kraft gesetzt. Das hat zur Folge, dass der Feeder – Layer nicht weiter wachsen kann, sich also im weiteren Verlauf nicht zwangsläufig vom Untergrund ablöst. Die Fähigkeit, das geeignete Mikroenvironment zu schaffen, bleibt dagegen bis zu 16 Wochen erhalten (Coutinho). Die im Layer und in der nicht – adhärenten Fraktion eventuell enthaltenen hämatopoetischen Zellen leben zwar weiter, können sich aber nicht mehr teilen oder differenzieren und treten daher im Methylzellulose-Assay nicht in Erscheinung.
Anschließend wird in einem zweiten Schritt Knochenmark aufgebracht. Dieses neu aufgebrachte Knochenmark wird auf seinen Gehalt an LTC-ICs untersucht: unter wöchentlichem Wechsel jeweils der Hälfte des Mediums wird die Kultur mindestens 5 Wochen lang bei 37°C und 5% CO2 inkubiert (Udomsaki 1992, Bertolini 1996, Bertolini 1997). Danach wird im Methylcellulose- Assay wie oben beim Ein – Schritt Verfahren beschrieben, die Klonogenität der eingebrachten Zellen getestet. Wie schon erwähnt, werden die eventuell vorhandenen hämatopoetischen Zellen aus dem Material, aus dem der Feeder – Layer etabliert wurde, hier nicht nachgewiesen, da sie durch die Bestrahlung ihre Teilungsfähigkeit verloren haben.

3.3.2 Feeder – Layer

Es gibt verschiedene Arten von Feeder – Layern, für die in der Literatur gute Ergebnisse in der LTC beschrieben wurden (u.a. Breems 1994, Sutherland 1991, Hogge 1996, Thalmeier 1996, Eaves 1991).
Oben angesprochen wurde schon der Feeder – Layer, der aus nativem menschlichen Knochenmark gezogen wurde. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass man für Kulturen, die zu verschiedenen Zeiten etabliert werden, Feeder – Layer aus verschiedenem Material verwenden muss.
Eine bessere Vergleichbarkeit der Kulturbedingungen würden Stroma - Zelllinien erlauben, die in kleinen Portionen bei –80°C tiefgefroren aufbewahrt werden. Sie könnten dann aufgetaut und vermehrt werden, wenn eine LTC etabliert werden soll, und würden für alle LTC´s den gleichen Feeder – Layer bieten.
In der Literatur sind neben vielen anderen Stroma - Zelllinien die L88/5, eine humane Zellinie und die M2 10B4, eine murine Zelllinie als geeignet beschrieben (Thalmeier 1994, Thalmeier 1996, Hogge 1996, Sutherland 1991).

3.4 Konservierung von hämatopoetischen Zellen

3.4.1 Indikationen

In einigen Situationen ist das extrakorporale Aufbewahren von menschlichen hämatopoetischen Stammzellen über einen längeren Zeitraum von Nöten.

3.4.1.1 **Autologe Knochenmark-/Blutstammzell-Transplantation (KMT/PBSCT)**

Bei der autologen Knochenmarktransplantation werden dem zum Beispiel an Leukämie, einem Lymphom oder auch an soliden Malignomen erkrankten Patienten Knochenmark- oder periphere Blutstammzellen entnommen und kryokonserviert. Danach kann sich der Patient einer aggressiven myeloablativen Hochdosis - Chemo- und / oder – Strahlentherapie unterziehen, die bei einigen malignen Erkrankungen mit höherer Wahrscheinlichkeit als

eine konventionelle Therapie zu einem kurativen Ergebnis oder wenigstens zu einer Remission führt. Die häufigste lebensbedrohliche Folge einer solchen Therapie ist eine schwere Knochenmarkdepression ohne Aussicht auf spontane Regeneration. Sie kann durch die Leukozytopenie zu Infektionen und Sepsis führen, durch die Thrombozytopenie zu bedrohlichen, auch letalen Blutungen und durch die Depression der erythropoetischen Reihe zu schweren Anämien. Zur Behandlung der Knochenmarkaplasie muß dem Patienten nach Beendigung der myeloablativen Therapie sein kryokonserviertes Knochenmark reinfundiert werden. Die Knochenmarkzellen finden durch als Homing beschriebene und bisher noch weitgehend ungeklärte Mechanismen den Weg zurück ins Knochenmark – Stroma und nehmen ihre blutbildende Tätigkeit wieder auf (Harrison 1997).

3.4.1.2 Allogene Knochenmark- /Stammzell-Transplantation (KMT/PBSCT)

Eine noch höhere kurative Potenz als autologe KMT oder PBSCT haben allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantationen. In der letzten Zeit sind mehr und mehr Knochenmark – Banken entstanden, die das Knochenmark von gesunden Menschen, die bereit wären, sich als Spender zur Verfügung zu stellen, auf Kompatibilitätsfaktoren testen. Dadurch beschränkt sich der Kreis der potentiellen Spender nicht mehr nur auf Blutsverwandte des Patienten, deren Knochenmark mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als das der Normalbevölkerung für den Patienten geeignet ist. Gelegentlich ist es aus logistischen Gründen nötig, das gespendete Knochenmark zu konservieren, bis es dem Patienten infundiert werden kann. Indikationen für allogene KMT/PBSCT sind neben der unter 3.4.1.1. erwähnten iatrogen verursachten Knochenmarksdepression bei Malignomen auch zum Beispiel die schwere aplastische Anämie, Thalassämien, die Sichelzellanämie und verschiedene hereditäre Immunschwächekrankheiten (Harrison 1997, Schleuning 2002).

3.4.1.3 Nabelschnurblut-Transplantationen

Das in der Nabelschnur enthaltene Blut enthält ebenfalls hämatopoetische Stammzellen, die für Stammzell - Transplantationen geeignet sind. Viele Mütter erklären sich bereit, die Nabelschnur und das darin enthaltene Blut zu spenden, statt es zu verwerfen. Dieses Blut wird auf seine Kompatibilitätsfaktoren hin getestet und kryokonserviert, bis ein Patient eben diese HLA-kompatiblen Stammzellen benötigt. Wegen der geringen Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen in diesen Präparaten eignet sich diese Stammzellquelle vor allem für pädiatrische Patienten (Harrison 1997).

3.4.2 Kühlung

Einfache Kühlung auf Temperaturen über 0°C verlangsamt zwar den Zellstoffwechsel, stoppt ihn aber nicht vollständig. Außerdem werden nicht alle Funktionen gleichermaßen beeinträchtigt, was zum Entgleisen essentieller Gleichgewichte führen kann. Desweiteren verursacht Kühlung auch direkt Schäden: Die Natrium / Kalium – Pumpe kehrt sich um, was dazu führt, dass die betroffenen Zellen anschwellen. Die Membran–Lipide

machen einen Phasenwechsel durch, der für sich genommen die Zelle schädigen kann und auch die Reaktionsrate membrangebundener Enzyme verändern kann (Gorin 1992).
Daraus ergibt sich, dass Zellen durch einfache Kühlung nur über eine gewisse Zeit konserviert werden können. Burnett et al. konnten zwar 1982 über erfolgreiche Knochenmarktransplantationen berichten, die mit Knochenmark durchgeführt worden waren, das 58 Stunden bei 4°C gekühlt gelagert wurde. Soll das Knochenmark aber über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten gelagert werden, ist Kühlung alleine nicht ausreichend, sondern es muß tiefgefroren werden (Gorin 1992).

3.4.3 Probleme beim Einfrieren und Auftauen

3.4.3.1 **Veränderungen der Osmolarität**

Knochenmark, das in isotoner Kochsalzlösung eingefroren wird, durchläuft verschiedene Veränderungen, die zum Tod der Zellen führen. Die genauen Mechanismen sind im Detail noch nicht verstanden. Untersuchungen beispielsweise an hämatopoetischen Stammzellen (Gorin 1992) oder artifiziellen Phosphatidylcholin-Bilayern (Yoon 1998) geben jedoch einige deutliche Hinweise:
Beim langsamen Einfrieren beginnt die Kristallisation des Lösungsmittels Wasser regelhaft in den extrazellulären Flüssigkeiten. Nachdem Eis nur verschwindend geringe Mengen an gelösten Stoffen enthält, steigen die Konzentrationen an gelösten Stoffen (vornehmlich Natrium-Chlorid) in dem noch nicht gefrorenen extrazellulären Wasser. Damit steigt die Osmolarität über isotonische 0,15 M und es sinkt der Gefrierpunkt. Durch die Hyperosmolarität der Extrazellulärflüssigkeit wird Wasser aus den Zellen gezogen (Yoon 1998). Die Zellen schrumpfen. Das hat zwei offensichtliche Folgen:

a) Die Konzentration an gelösten Stoffen steigt intrazellulär.
b) Die nicht-flüssigen intrazellulären Komponenten, beispielsweise die Membranen, werden einander teilweise auf weniger als einen Nanometer angenähert, was zu sogenannten Membran – Stapeln führt und Membrandeformitäten und Membranschädigungen verursacht (Yoon 1998).

Für das extrazelluläre Wasser bedeutet das folgendes:
Je tiefer die Temperatur, desto größer wird der bereits zu Eis gefrorene Teil des Wassers, der ja praktisch keine gelösten Stoffe enthält. Bei einer ursprünglich isotonischen SodiumChlorid-Lösung von 0,15 M steigt die Molariät des verbleibenden Wassers bis auf 5,2 M. Der Gefrierpunkt liegt jetzt bei –21,1°C, dem sogenannten Eutetischen Punkt. Hier geht auch die verbliebene hochmolare Flüssigkeit in die feste Phase über (Gorin 1992).

3.4.3.2 **Phasenübergang**

Wenn Wasser aus der flüssigen in die feste Phase übergeht, setzt es dabei seine Kristallisationsenergie frei.
Je länger der Phasenübergang dauert, desto ausgeprägter sind die Zellschädigungen (Gorin 1992 nach Rowe and Rinfret 1962, Lewis 1967). Daher ist es wichtig, dass das Einfrierprogramm diese freiwerdende Wärme ausgleicht, indem es mehr Kälte z.B. in Form von flüssigem Stickstoff zuführt, um so die Kühlungsrate konstant zu halten. Das ist um so bedeutsamer, je größer die eingefrorenen Volumina sind (Gorin 1992).

Nach Freiwerden der Kristallisationsenergie muss die Einfrierrate gering gehalten werden, um eine optimale Überlebensrate der Zellen zu erreichen. Bewährt hat sich zu diesem Zeitpunkt eine Einfrierrate von 1°C pro Minute (Gorin 1992, Gorin nach Rowe 1966).

3.4.3.3 Intrazelluläre Eisbildung

Osmotische Veränderungen schädigen Zellen stärker, je langsamer die Kühlungsrate ist, je vollständiger also dem osmotischen Druck entsprochen werden kann.
Sehr rasche Kühlung könnte dieses Risiko zwar verringern, würde aber zu intrazellulärer Eiskristallbildung und damit zu Zellschädigungen führen (Sherman 1976, Gorin 1992). Bei langsamem Einfrieren beginnt die Eisbildung dagegen im Extrazellulärraum (Yoon 1998), während im Intrazellulärraum auch eine flüssige Phase bestehen bleibt.

3.4.3.4 Auftauen

Intrazelluläre Eiskristalle erhöhen, wie oben beschrieben, das Risiko für das Entstehen von Zellschäden. Während des Auftauens wachsen diese Eiskristalle, und zwar um so mehr, je langsamer die Auftaurate ist (Leibo 1970). Um also das Risiko für Zellschäden so gering wie möglich zu halten, müssen die Zellen schnell aufgetaut werden (Sherman 1973, Walter 1999), beispielsweise im 37°C Wasserbad (Reid 1999).

3.4.4 Wirkungsmechanismen von Einfriermedien

3.4.4.1 Allgemein

Die Zugabe von kryoprotektiven Substanzen erlaubt es, die Kühlungsraten zu verlangsamen (Gorin 1992) und so intrazellulärer Eisbildung vorzubeugen, ohne zu starke Membranschädigungen durch osmotische Effekte in Kauf nehmen zu müssen (Yoon 1998).
Die genauen Wirkmechanismen kryoprotektiver Substanzen sind nicht bekannt. Man kann aber davon ausgehen, dass die folgenden Aspekte zur Wirksamkeit beitragen:
Frostschutzmittel binden Wassermoleküle (osmotischer Effekt) und verzögern so die extrazelluläre Eisbildung. Dadurch verlangsamt sich der Anstieg des osmotischen Drucks, der Wasser aus den Zellen zieht. Die Kühlungsrate kann also verlangsamt werden, ohne dass die Zellen zu stark schrumpfen (Gorin 1992).
Die unterschiedlichen Kryoprotektiva wirken außerdem durch spezifische Mechanismen, die durch ihre jeweiligen Eigenschaften bedingt sind (Yoon 1998).
Um die Wirkungsweise verschiedener Frostschutzmittel wenigstens im Ansatz zu verstehen, ist es wichtig zu wissen, ob sie in die Zellen eindringen oder nicht. Diese Eigenschaft ist jedoch kein Indikator für die Potenz der Substanz. So penetriert DMSO die Zellmembranen sehr rasch, Glycerol langsam und PVP und Hydoxyethylstärke (HES) dringen überhaupt nicht in Zellen ein (Gorin 1992). Sherman und Liu veröffentlichten 1973 und 1976, dass die Kryokonsevierung von Ratten-Pankreas mit Glycerol am besten gelang, wenn das Gewebe vor dem Einfrieren einige Zeit bei 0°C mit Glycerol inkubiert wurde. Bei dieser Temperatur penetriert

Glycerol die Zellmembranen überhaupt nicht. Intrazelluläres Glycerol führte dagegen zu ausgeprägten Zellschäden während des Einfriervorgangs (Sherman 1976, Sztein 2001).

3.4.4.2 DMSO und Trehalose

Spezifischer Effekt:

Yoon et al (1998) berichteten, dass bei mit DMSO gefrorenen Zellen die DMSO/Lipid-Ratio in den Zellen bei tieferen Temperaturen zunimmt. Wenn die extrazelluläre Eisbildung beginnt, steigt die Konzentration von DMSO-Molekülen im noch übrigen extrazellulären Wasser, weil Eis praktisch keine gelösten Stoffe enthält. Da Bilayer-Zellmembranen für DMSO permeabel sind (Yoon 1998), dringt DMSO in die Zellen ein, um gleiche Konzentrationsverhältnisse zu erreichen. Bei tieferen Temperaturen ist also mehr DMSO in den Zellen als bei höheren Temperaturen, während sich der Lipidgehalt natürlich nicht verändert.

Dagegen fanden Yoon et al keine Erhöhung der Trehalose-Molekülzahl in der Lamellaren Phase (= Modell für die dehydrierte Zelle) bei Temperaturerniedrigung und folgerten daraus, dass Trehalose vermutlich zumindest nicht temperaturabhängig Membranen durchdringt (Yoon 1998). Diese Ergebnisse bestätigen die häufig vertretene Meinung, dass Trehalose Zellmembranen nicht durchdringt (Sztein 2001). Dagegen fanden Beattie et al bei ihren Untersuchungen zur Kryokonservierung von Pankreasinselzellen, dass Trehalose beim Tiefkühlen während des Durchschreitens des Lipid-Phasen-Übergangs (lipid-phase-transition) in die Inselzellen eindringt (Beattie 1997).

Osmotischer Effekt:

Nach den Untersuchungen von Yoon et al. (1998), die z.T. mit hochmolaren Lösungen durchgeführt wurden, zeigte DMSO bei allen Temperaturen gleichbleibend den Effekt, dass die lamellare Phase stärker hydriert blieb, als das bei der gleichen Situation ohne DMSO der Fall war. Die Quantität der Hydrierung entspricht der, die auf Grund der Osmolarität von DMSO erwartet wurde.

Bei Trehalose ergab sich in Versuchen, die mit sehr hohen Konzentrationen durchgeführt wurden, dass die Hydrierung hinter den Erwartungen zurückblieb, die sich auf Grund der rein osmotischen Verhältnisse ergeben.

Phase transition temperature:

Beim Einfrieren, Gefriertrocknen und Dehydrieren von Zellen erhöht sich die Phasen-Übergangs-Temperatur (phase transition temperatur) Tm (Yoon 1998, Leslie 1997, Sano 1999, Crowe 1992). Eine Erhöhung der Übergangstemperatur zwischen der flüssig-kristallinen und der Gel-Phase erhöht die Permeabilität der Membranen und kann so zum Zelltod führen (Crowe 1992, Leslie 1994, de-Aranjo 1996). Die Tm-Erhöhung wird durch Zugabe von Trehalose-Lösungen reduziert (Leslie 1995, Sano 1999, de-Araujo 1996), bei Zugabe von hochmolarer Trehalose sogar stärker als das bei DMSO der Fall ist (Yoon 1998).

3.4.5 Trehalose

3.4.5.1 Trehalose – produzierende Spezies

Wie oben beschrieben (3.4.3.) geht das Einfrieren von Zellen mit einer Dehydratation derselben einher (Yoon 1998, Gorin 1992), wenn auch Tiefkühlen und Dehydaration keine identischen Stessfaktoren sind (Crowe 1992).

Es gibt verschiedene Spezies, die extremes Austrocknen, bis zu einem Verlust von > 99% ihres Körperwassers überleben (Crowe 1992, de-Araujo PS 1996). Zu diesen Organismen gehören unter anderem die Bäckerhefe (Saccharomyces cervisiae), die Nematode Aphelenchus und andere Pilze und Bakterien. Ihnen allen ist die Eigenschaft gemeinsam, in bestimmten Stesssituationen das Disaccherid Trehalose produzieren zu können (Crowe1992). Insbesondere bezüglich der Bäckerhefe gibt es zahlreiche Untersuchungen, die zeigen, dass die Fähigkeit Trehalose zu produzieren, wie auch die Zugabe von externer Trehalose positiv mit den Überlebensraten nach Tiefkühlen bzw. nach Dehydatation korrelieren (Diniz-Mendes 1999, Cerrutti 2000, Sano 1999, de-Araujo 1996, Zikmanis 1988, Leslie 1994).
Diese Erkenntnisse, wie auch die Erfahrungen, dass einige andere Disaccharide wie z.B. Glycerol und Suchrose kryoprotektive Eigenschaften haben, legten es nahe, Trehalose auch als Frostschutzmittel für Organismen, Gewebe und Zellen zu testen, die den Stoff nicht selbst produzieren.

3.4.5.2 Trehalose als extern zugefügtes Frostschutzmittel

Trehalose wurde als Kryoprotekivum für verschiedene Organismen, Gewebe und Zellen getestet. So berichteten beispielsweise Leslie et al 1995 über die erfolgreiche Gefriertrocknung mit anschließender Rehydratation von Escherichia coli und Bacillus thuringiensis mit Trehalose. 1997 zeigten Beattie et al die Überlegenheit eines Trehalose-DMSO-Gemisches als Kryoprotektivum gegenüber reinem DMSO für humane Pankreasinselzellen. Kappicht (2000) verglich DMSO und Trehalose als Kryoprotektiva für humane hämatopoetische Zellen. Sie verglich die Vitalität der verschiedenartig kryokonservierten Zellen und kam zu dem Ergebnis, dass die mit DMSO gefrorenen Zellen die höchste Vitalitätsrate haben. Zur Prüfung der Repopulationsfähigkeit der kryokonservierten Zellen benutzte sie Methylzellulose-Assays. Hier wurden die Zellen 2 Wochen lang inkubiert und im Anschluß die Kolonien abgelesen, die die inkubierten Zellen gebildet hatten. Hier zeigte sich, dass die mit Trehalose gefrorenen Zellen eine deutlich höhere Potenz zur Koloniebildung hatten, als die mit DMSO gefrorenen Zellen. Insbesondere bei der Zahl der gemischten Kolonien, die ein Indikator für frühe Vorläuferzellen sind, war Trehalose als Kryoprotektivum dem DMSO überlegen.

3.4.6 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Das derzeit am weitesten verbreitete Einfriermedium für Knochenmarkzellen ist Dimethylsulfoxid (DMSO). Bei Patienten, die mit DMSO-kryokonserviertem Knochenmark transplantiert werden, geben allerdings einige beobachtete Nebenwirkungen, die wohl auf die Verwendung von DMSO zurückzuführen sind, Anlass zur Sorge.

3.4.6.1 Unerwünschte Wirkungen

DMSO steht im Verdacht hämatopoetische Progenitorzellen zu schädigen. Dounay et al fanden 1982, dass DMSO-Exposition bereits in klinisch relevanten Konzentrationen von 10% bei 4°C einen erheblichen Verlust an Progenitoren der weißen Reihe verursacht. Rowley (1993) fand in seinen Untersuchungen dagegen keinen Hinweis auf eine direkte Toxizität von DMSO in niedrigen Konzentrationen. Für DMSO in Konzentrationen von 40% dagegen wies er nach, dass hämatopoetische Vorläuferzellen in vitro direkt geschädigt wurden. Um das

Risiko einer Zellschädigung im Transplantat so gering wie möglich zu halten, ist es gängige Praxis, das gefrorene Knochenmark-Transplantat sofort nach dem rapiden Auftauen bei 4°C zu infundieren.
Aber auch unabhängig von den Reaktionen des Organismus auf die niedrige Transplantattemperatur sind andere unerwünschte Wirkungen zu beobachten, die direkt auf den Gehalt von DMSO im Transplantat zurückzuführen sind. DMSO wurde, früher mehr als heute, nicht nur als Kryoprotektivum verwendet, sondern zur Therapie verschiedener Krankheiten percutan oder intravenös verabreicht. Auf Grund der dabei beobachteten, für die Patienten belastenden und zum Teil lebensgefährlichen Nebenwirkungen wurde DMSO außer bei der Knochenmark- oder Stammzelltransplantation mit kryokonserviertem Material, bei der bisher keine adäquate Alternativsubstanz zur Verfügung steht, aus den meisten Therapieschemata verdrängt. Brobyn (1975) beschreibt beispielsweise für die Applikation von DMSO als Externum als häufigste beobachtete Nebenwirkungen Sedierung, Cephalgien, Nausea und Schwindel. Muther et al (1980) untersuchten den Effekt von intravenöser DMSO-Gabe auf die Nierenfunktion und fanden eine dosisabhängige reversible Hämolyse mit konsekutiver Hämoglobinurie. Im Gegensatz zu anderen Untersuchern (Yellowlees 1980) beobachteten sie keine wesentliche Einschränkung der Nierenfunktion. Yellowlees et al fanden bei Patienten nach intravenöser DMSO-Gabe neben deutlich erhöhten Kreatininwerten - bei einer Patientin Oligurie und andere Parameter des Nierenversagens - unter anderem signifikant verkürzte PTT, erhöhte Leberenzyme und zeitlich verzögert auftretende Anämie. An klinischen Symptomen wurden unter anderem Schläfrigkeit bis zur Bewustlosigkeit und ein Flapping tremor beobachtet. Eine Patientin erlitt, wohl als Folge ihrer durch DMSO veränderten Gerinnungswerte und des durch Erbrechen bedingten Flüssigkeitsverlustes einen Apoplex.
Bei der Infusion von Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen, die mit DMSO kryokonserviert waren, wurden folgende Reaktionen am häufigsten beobachtet (Kappicht 2000, Okamoto 1993, Stroncek 1991, Kessinger 1990, Davis 1990): Hämoglobinurie, Nausea, Fieber, Schüttelfrost, Erbrechen, Tachy- und Bradykardien, abdominale Krämpfe, Flush-Symptomatik und vorübergehende, z.T. behandlungsbedürftige Hypertension. Patienten, die mit autologem DMSO-kryokonserviertem Knochenmark transplantiert wurden, hatten signifikant häufiger unter Übelkeit, Erbrechen, Schüttelfrost und Fieber zu leiden, als Patienten, die allogenes frisches Knochenmark erhalten hatten (Stroncek 1993). Die Häufigkeit von Erbrechen korrelierte positiv mit der Menge an infundiertem DMSO, während das bei Übelkeit nicht der Fall war (Stroncek 1993).

3.4.6.2 Komplementaktivierung

Der genaue Pathomechanismus für die oben beschriebenen Nebenwirkungen ist nicht bekannt. Einige Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Zugabe von DMSO zu Zellsuspensionen, wie auch zu Plasma in vitro eine Komplementaktivierung verursacht (Böck 1995, Laver 1995). Laver (1995) untersuchte die Veränderungen, die DMSO in humanem Plasma bewirkt und fand keine Erhöhung von C4a, jedoch eine deutliche Erhöhung von C3a. Er folgerte daraus, dass die durch DMSO ausgelöste Komplementaktivierung ausschließlich über den alternativen Pathway stattfand, nicht aber über den klassischen Pathway. Dagegen fanden Böck et al in ihren Untersuchungen, dass DMSO in Thrombozytenkonzentraten, wie auch in frisch isoliertem zellfreiem Plasma eine Erhöhung sowohl von C3a als auch von C4a verursacht. C3a und C4a sind in ihrer Eigenschaft als Anaphylatoxine zwar inaktiv (Böck 1995), bewirken aber in Zellsuspensionen verschiedene Veränderungen: So aktivieren sie beispielsweise Thrombozyten, verhindern andererseits aber eine maximale Reaktion der

Thrombozyten auf externe Stimuli. Das kann eine höhere Koagulabilität bedeuten und damit ein höheres Risiko für Thrombosen bei gleichzeitig verlängerter in vitro Blutungszeit (Schleuning 1994, Schleuning 1992, Böck 1995, Böck 1992). Diese in vitro Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass die durch DMSO verursachte Komplementerhöhung für einige der bei Knochenmarkstransplantationen auftretenden Komplikationen ursächlich sein könnte. 2000 zeigte Kappicht, dass das Ausmaß der Komplementaktivierung in vivo tatsächlich positiv mit der Häufigkeit und Intensität der bei Knochenmark- und Stammzelltransplantationen beobachteten Nebenwirkungen korreliert.

4. Eigene Untersuchungen

4.1 Material

4.1.1 Knochenmark

4.1.1.1 **Spender**

Für die Langzeitkulturen wurde Knochenmark gesunder Spender verwendet. Das in den Versuchen zum Vergleich DMSO - Trehalose verwendete Knochenmark war mindestens 8 Monate, aber nicht länger als 12 ½ Monate gefroren. Das bei der Entwicklung einer geeigneten LTC- und Einfriermethodik verwendete Knochenmark war 9 bzw. 22 Tage lang gefroren aufbewahrt worden.
Für den Radioimmunoassay wurde Knochenmark von gesunden, wie auch von an CML, bzw. an einem Osteosarkom erkrankten Spendern verwendet. Das Knochenmark war mindestens 12 Monate, aber nicht länger als 24 Monate gefroren.

4.1.1.2 **Knochenmarkentnahme**

In der Jose´-Carreras-Abteilung für Knochenmarktransplantation der Medizinischen Klinik III der Münchner Universitätsklinik Großhadern wurde das Knochenmark entnommen. Die Knochenmarkentnahme erfolgte nach schriftlichem Einverständnis in Vollnarkose aus dem Beckenkamm. Das Knochenmark wurde mit Hilfe von Beckenkammbiopsiekanülen (Durchmesser: 2,5mm; Firma Ulrich, Ulm, Deutschland) aspiriert und sofort im Anschluß mit 10 Vol% ACD-A (Firma Baxter, Maurepas, Frankreich) und 1000 IE Heparin (Heparin-Natrium, Firma Braun, Melsungen, Deutschland) versetzt. Das so antikoagulierte Knochenmark wurde gefiltert und in Kunststoff-Beuteln gesammelt.
Aus diesen Beuteln wurde das Knochenmark entnommen, das in den hier beschriebenen Versuchen verarbeitet wurde.

4.1.2 Zellkulturmedien und Waschlösungen

Lösung	Beschreibung	Bezugsquelle
IMDM 12440	$CaCl_2$ $2H_2O$ 219,00 mg/l KCl 330,00 mg/l KNO_3 0,076 mg/l $MgSO_4$ 200,00 mg/l NaCl 4505,00 mg/l $NaHCO_3$ 3024,00 mg/l NaH_2PO_4 $2H_2O$ 141,00 mg/l Na_2SeO_3 $5H_2O$ 0,017 mg/l D-Glucose 4500,00 mg/l Phenolrot 15,00 mg/l HEPES 5958,00 mg/l Na-Pyruvat 110,00 mg/l L-Alanin 25,00 mg/l L-Asparagin H_2O 28,40 mg/l L-Arginin HCl 84,00 mg/l L-Asparaginsäure 30,00 mg/l L-Cystin 70,00 mg/l L-Glutaminsäure 75,00 mg/l L-Glutamin 584,00 mg/l Glycin 30,00 mg/l L-Histidin HCl H_2O 42,00 mg/l L-Isoleucin 105,00 mg/l L-Leucin 105,00 mg/l L-Lysin HCl 146,00 mg/l L-Methionin 30,00 mg/l L-Phenylalanin 66,00 mg/l L-Prolin 40,00 mg/l L-Serin 42,00 mg/l L-Threonin 95,00 mg/l L-Tryptophan 16,00 mg/l L-Thyrosin 104,20 mg/l L-Valin 94,00 mg/l Biotin 0,013 mg/l D-Ca-Pantothenat 4,00 mg/l Cholinchlorid 4,00 mg/l Folsäure 4,00 mg/l i-Inositol 7,20 mg/l Nikotinamid 4,00 mg/l Pyridoxal HCl 4,00 mg/l Riboflavin 0,40 mg/l Thiamin HCl 4,00 mg/l Vitamin B_{12} 0,013 mg/l	Gibco BRL, Paisley, Schottland
MyeloCult	12,5% Horse Serum 12,5% Fetal Bovine Serum 0,2mM I-Inositol 20µM Folic Acid 10^{-4}M 2-Mercaptoethanol 2mM L-Glutamin Alpha-MEM	Stemcell Technologies Inc. Canada
Methocult GF H4434	0,9% Methylzellulose in Iscove´s MDM 30% FKS 1% Bovines Serumalbumin 3 U/ml rh Erythropoietin 10^{-4} M 2-Mercaptoethanol 2 mM L-Glutamin 50 ng/ml rh Stammzellfaktor 10 ng/ml rh GM-CSF, 10 ng/ml rh IL-3	Stemcell Technologies Inc. Canada
PBS Dublecco´s	0,2 g/l KCl0, 2 g/l KH_2PO_4, 8,0 g/l NaCl, 1,15 g/l Na_2HPO_4 ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}, $NaHCO_3$	Gibco BRL, Paisley, Schottland
RPMI Medium 1640	mit L-Glutamin, ohne Phenolrot	Gibco BRL, Paisley, Schottland

4.1.3 Zusätze

Lösung	Beschreibung	Bezugsquelle
PenStrep = Penicillin-Streptomycin	Penicillin G 10000 units/ml Streptomycin 10000µg/ml in 0,85% NaCl-Lösung	Braun, Melsungen Deutschland
HSS	Hydrocortisone 21-Hemisuccinate Sodium Salt	Sigma No H-2270
FCS, USA, Lot No. 50E42	fetal calf serum	BioConcept GmbH, Umkirch, Deutschland

4.1.4 Einfriermedien

Lösung	Beschreibung	Bezugsquelle
Trehalose	D(+)Trehalose α-D-Glucopyranosyl- α-D-Glucopyranosid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
DMSO	Dimethylsufoxid (C_2H_6SO) mindestens 99,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Humaninsulin	humanes Normalinsulin 400IE/ml	Hoechst AG Frankfurt a. M., Deutschland
Isotone Kochsalzlösung	Natriumchlorid 0,9 g/100ml	Braun, Melsungen, Deutschland

4.1.5 Antikoagulantien

Lösung	Beschreibung	Bezugsquelle
ACD-A	8,0 g Acid. Citr. monohydr 22,0 g Natr. Citr. dihydr 24,5 g Glucos. monhydr. 1000 ml Aqua ad inject. pH: 4,7 bis 5,3	Baxter, Maurepas Frankreich
Heparin	Heparin-Natrium, 10000 IE/ml	Braun, Melsungen Deutschland

4.1.6 Sonstige Reagenzien

Lösung	Beschreibung	Bezugsquelle
Ficoll	d = 1,077 g/ml	Biochrom KG, Berlin Deutschland
Trypan-Blau	0,4%	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Türk´sche Lösung	Essigsäure-Genitianaviolett-Lösung C.I.Nr. 42535 0,1g/l CH_3COOH 10,0g/l	Merck Diagnostica E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Wasser für Injektionszwecke	Braun, Melsungen, Deutschland

4.1.7 Zellkulturgefäße

sterile Gewebekultur – Petrischalen (tissue culture) von Cellstar der Firma Greiner Labortechnik

94/16 mm und 35/10 mm

sterile TC (tissue culture) – Flaschen, canted neck

75 cm^2 Bodenfläche, Bezugsquelle: Costar

25 cm^2 Bodenfläche, Bezugsquelle: Corning

4.1.8 Pipetten und Zubehör

Pipette	Zubehör	Verwendungszweck
Finnpipette Digital Bezugsquelle: Labsystems Volumenbereiche: 0,5 – 10 µl 5 –40 µl 40 – 200 µl 200 – 1000 µl	Finntip 250 aus virgin polypropylen Volumenbereich: 0,5 – 250 µl Bezugsquelle: Labsystems Oy Finntip 61 aus virgin polypropylen Volumenbereich: 200 – 1000 µl Bezugsquelle: Labsystems Oy	zum pipettieren kleiner Mengen von Substanzen geringer Zähigkeit
Automatic Sarpette Bezugsquelle: Desaga, Sarstedt Gruppe	10 ml und 5 ml Pipet, in 1/10 ml steril, einzeln verpackt Bezugsquelle: Gold Seal	zum pipettieren größerer Mengen von Substanzen geringer Zähigkeit
Handdispender HandyStep Bezugsquelle: Brand, Fabrik für Laborgeräte	Präzesionsdispenser – Tips, 5ml steril, einzeln verpackt Bezugsquelle: Brand, Fabrik für Laborgeräte	zum pipettieren von Substanzen großer Zähigkeit

4.1.9 Pipettiergefäße

Produkt	Bezugsquelle
Primavette K3E, 10 ml EDTA – Röhrchen, steril	Braun
LeucoSep, steril, für 15 – 30 ml	Greiner Labortechnik
Gewebekulturröhrchen mit rotem Schraubverschluß, steril	Greiner Labortechnik
Einfriergefäß Cryogenic Vial, steril, 2 ml	Nalgene

4.1.10 Geräte

Produkt	Bezugsquelle
Lamina air flow: Uniflow UVUB 1200	UniEquip
Zentrifuge: Hermle ZK 364	BHG Hermle
CO2 – Inkubator TABAI BNA – 310	Tabai espec corporation
Einfriergerät: intelligent freezing chamber TRA – 14, Biologisches Einfriersystem CPR133	Consarctic GmbH, Schöllkrippen Cryoson Hi-Tech BV 199
Stickstoff – Tonne: Arpege 110	AirLiquide
Gefrierschrank –20°C: Economic froster ****	Bosch
Gamma-Strahlen-Quelle Gammacell 40	Standort: GSF, Macioninistraße München, Hämatologikum, Raum 909
Gamma Counter 1261 Multigamma	LKB Wallac
MS1 Minishaker, 200 – 2500 /min	IKA
Durchlichtmikroskop	Zeiss
Auflichtmikroskop	Zeiss

4.2 Methoden

4.2.1 Langzeitkultur

Essentiell für das Überleben einer Langzeitkultur, die sich insgesamt über 10 Wochen erstreckt, sind sterile Arbeitsbedingungen. Um dem Rechnung zu tragen, wurden Behältnisse mit Zellsuspensionen und Medien nur in einer Sterilbank geöffnet, die regelmäßig mit 70%igem Alkohol gereinigt wurde. Auch sterile Petrischalen und Zellkulturflaschen, die später im Brutschrank inkubiert werden sollten, wurden nur in der Sterilbank ausgepackt. Außerdem wurden nicht sterile, puderfreie Latexhandschuhe verwendet, die wiederholt mit Alkohol desinfiziert wurden, insbesondere, wenn mit Flaschen und Petrischalen umgegangen wurde, die später in den Inkubator gestellt werden mussten.

Das Innere des Inkubators selbst wurde zwischen den Versuchen regelmäßig mit Alkohol gereinigt, die herausnehmbaren Teile sterilisiert. Die Wasserwanne wurde wöchentlich mit Alkohol desinfiziert, wobei vor dem Einfüllen von frischem Aqua bidest gewartet wurde, bis aller Alkohol abgetrocknet war.

Der Inkubator erzeugt eine 5%ige CO_2-Atmosphäre, hohe Luftfeuchtigkeit und eine konstante Temperatur von 37°C.

In den meisten Zellkulturmedien ist ein Bikarbonat-Puffer enthalten, der bei der Dissoziation CO_2 freisetzt.

Der konstantgehaltene CO_2-Gehalt der Atmosphäre im Inkubator sorgt für einen gleichbleibenden pH-Wert des Mediums.

Die Temperatur von 37°C entspricht der menschlichen Körpertemperatur und ist so eine gute Vorraussetzung für das Etablieren von humanen Knochenmark-Zellkulturen.

Die hohe Luftfeuchtigkeit schützt die Kulturen vor dem Austrocknen und damit vor Konzentrationsänderungen der im Medium enthaltenen Stoffe.

4.2.1.1 **Arbeitsschritte**

4.2.1.1.1. *Kryokonservierung*

Die Zellzahl/ml im Knochenmark (wie entnommen, s. 4.1.1.2) wurde mit Türk´scher Lösung gezählt, 1 : 1 in einem Stickstoff-tauglichen Kryoröhrchen mit dem entsprechenden Einfriermedium (DMSO bzw. Trehalose) gemischt und sofort in Eis gepackt zu einem Einfriergerät gebracht. Dieses Einfriergerät kühlt die Proben computergesteuert in verschiedenen Schritten bis auf –80°C (s. 3.4.3.2.), entsprechend der optimalen Einfrierkurve für mit DMSO gemischtes Knochenmark. Mit Trehalose gemischtes Knochenmark wurde ebenso und auch zeitgleich eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden dann in einem tragbaren Stickstoff-Behälter zu der Stickstofftonne gebracht, in der sie bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff bei –80°C aufbewahrt wurden.

4.2.1.1.2. *Langzeitkultur*

Etablierung des Feeder-Layers

Zunächst wurde ein Feeder-Layer über etwa drei Wochen in einer Tissue Culture - Flasche etabliert. Das genaue Vorgehen ist entsprechend dem jeweiligen Feeder-Layer unter Punkt 4.2.1.2.3. bis 4.2.1.2.5. beschrieben.

War der Feeder-Layer konfluent, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Das Medium wurde vorsichtig abgenommen, ohne dabei mit der Pipettenspitze den Layer zu beschädigen. Entsprechend der Flaschengröße wurden 20ml (75 cm^2 Grundfläche) bzw. 7 ml (25 cm^2 Flasche) PBS vorsichtig auf den Layer getropft und ca. 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurde das PBS abgenommen. Durch dieses Vorgehen wurde der überwiegende Teil des Serums entfernt, das aus dem Medium stammte und noch am Layer gehaftet hatte.

Jetzt wurde entsprechend der Größe der Flasche Trypsin auf den Layer gegeben: 2,5 ml pro 75 cm^2 - Flasche; 1ml pro 25 cm^2 - Flasche. Der Layer wurde mit dem Trypsin 10 bis 25 Minuten bei 37°C inkubiert, bis die Layer-Zellen im Durchlicht-Mikroskop rund erschienen, sich also voneinander und vom Flaschenboden gelöst hatten. Die Trypsinwirkung wurde dann mit der gleichen Menge FCS gestoppt. Es ist entscheidend, dass die Flasche mit dem Layer streng waagrecht gehalten wird, damit der Layer sich zu keinem Zeitpunkt als Haut vom Flaschenboden ablöst. Wenn das passiert, ist es kaum noch möglich, die Layer-Zellen zu vereinzeln. Im weiteren wurde entsprechend dem jeweiligen Layer so verfahren, wie es unter 4.2.1.2.3. bis 4.2.1.2.5. beschrieben ist.

Der konfluente Layer wurde dann je nach Layerart unterschiedlich lange mit einer Gamma-Strahlen-Quelle (Gammacell 40) bestrahlt: Primär humaner Layer wurde mit 16 gray bestrahlt, Layer aus der murinen Zelllinie M2 10B4 mit 60 gray und Layer aus der humanen Zelllinie 88/5 mit 15 gray.

Diese Bestrahlung lässt die Zellen überleben, unterbindet aber jede weitere Zellteilung. Damit wird zum einen dafür gesorgt, dass der Layer nicht weiterwächst und sich dann in der Folge ablöst. Zum anderen wird verhindert, dass eventuell im - vor allem primären humanen - Layer selbst enthaltene hämatopetische Zellen zur Teilung kommen und so Kulturen bilden, die man dann fälschlicherweise dem Knochenmark zuordnen würde, mit dem man den Layer besät. Das mitbestrahle Medium wurde daraufhin entfernt und durch frisches Medium ersetzt.

Dann wurde der sogenannte Recharge vorgenommen, d.h. auf den Feeder-Layer wurden hämatopoetische Zellen aufgebracht.

Zelleinsaat (Recharge)

Es wurden für mit DMSO und für mit Trehalose gefrorenes Knochenmark je ein steriles Kunststoffröhrchen vorbereitet und mit 10 ml RPMI pro 2ml Kryoröhrchen bestückt. Das gefrorene Knochenmark-Kryoreagenz-Gemisch wurde im 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort zu dem vorgelegten RPMI dazupipettiert. Dann wurden die mononukleären Zellen durch Zentrifugation über einem Dichtegradienten angereichert (s. 4.2.1.2.1.) und im Anschluß die adhärenten Zellen eliminiert (4.2.1.2.2.).

Die so angereicherten Zellen wurden mit Türk´scher Lösung gezählt, das Volumen der beiden Zellsuspensionen bestimmt und das Volumen berechnet, das $5x10^5$ Zellen enthält.

Von den mit Feeder-Layer bestückten Petrischalen wurde das Medium entfernt.

Dann wurden 2ml abzüglich dem berechneten Volumen Zellsuspension an MyeloCult-Medium auf den Layer vorgelegt, und die berechnete Menge an Zellsuspension zugegeben.
Die so bestückten Petrischalen wurden 5 Wochen lang bei 37°C, 5% CO2 und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen und gleichzeitig das Kontaminationsrisiko zu senken, wurden je zwei Kulturen-enthaltende 35mm Petrischalen mit Deckel und eine Aqua bidest enthaltende Petrischale ohne Deckel in eine 94 mm Petrischale mit Deckel gesetzt. Einmal wöchentlich wurde 1 ml des Mediums vorsichtig abgenommen, ohne dabei den Layer zu berühren, und durch frisches Medium ersetzt.
Nach der 5. Woche wurden die Langzeitkulturen aufgelöst und die hämatopoetischen Zellen aus Überstand und Layer in Methylzellulose umgesetzt.

4.2.1.1.3. Umsetzen der hämatopoetischen Zellen in eine Methylzellulose-Kurzzeitkultur

Der Überstand mit den nicht-adhärenten Zellen wurde abgenommen und in ein steriles Kunststoffröhrchen pipettiert. 1 ml PBS wurde vorsichtig auf den Layer getropft, die Petrischale leicht geschwenkt, dann das PBS wieder abgenommen und zu den nicht-adhärenten Zellen in das Kunststoffröhrchen gegeben.
Jetzt wurden die Layerzellen vereinzelt:
0,4 ml Trypsin wurde vorsichtig auf den Layer gegeben, die Petrischale leicht bewegt, damit das Trypsin sich auf der ganzen Layerfläche verteilt. Jetzt wurde der Layer mit dem Trypsin bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vereinzelt haben, also im Mikroskop rund erscheinen. Dann wurde die Trypsinwirkung mit 0,4 ml FCS gestoppt: 0,4 ml FCS wurden vorsichtig auf den Layer pipettiert und die Petrischale vorsichtig geschwenkt, bis sich Trypin und FCS vermischt haben. Jetzt wurden die Layerzellen und die darin enthaltenen hämatopoetischen Zellen mit einer Pipette mit einer kleinen sterilen Einmal-Pipettenspitze (Finntip250) gemischt und dadurch mechanisch vereinzelt.
Die Zellsuspension wurde nun je nach Experiment in ein separates steriles Kunststoffröhrchen pipettiert oder zu den nicht-adhärenten Zellen zugegeben, ebenso wurde mit 1 ml PBS verfahren, mit dem die nun leere Petrischale gespült wurde, um möglichst alle Zellen zu gewinnen.
Die Zellsuspensionen mit den adhärenten und bzw. oder den nicht-adhärenten Zellen wurden 10 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets mit dem Minishaker verschüttelt.
Zu den Pellets wurde je nach Experiment 150 - 400 Mikroliter IMDM zugegeben, um durch die höhere Verdünnung die durch die nun folgenden Manipulationen auftretenden Zellverluste gering zu halten und die Folgen der Meßungenauigkeit zu verringern.
Nun wurde das exakte Volumen bestimmt. Je nach Experiment wurden der Methylzellulose die Hälfte oder ein kleinerer Bruchteil des Pellets zugegeben. Besonders bei den ersten Experimenten war es nicht vorhersehbar, welche Zelleinsaat in die Methylzellulose wie viele Kolonien hervorbringen würde. Um aber immer zu garantieren, dass die Kolonien zuverlässig ablesbar waren, sich also nicht etwa überlappten, wurden mehrere Verdünnungen angelegt. Beispielsweise wurde eine Methylzellulose-Kultur mit der Hälfte des Zellsuspensions-Volumens besät, eine mit einem Zehntel, eine mit einem Fünfzigstel und eine mit einem Hundertstel des Suspensionsvolumens.

Damit bei allen Kulturen die Viskosität die gleiche ist, wurden zu 2 ml Methylzellulose insgesamt noch 350 Mikroliter zugegeben, bestehend aus der Zellsuspension und ergänzt mit IMDM. Aus diesen nun 2,35 ml wurden nun in zwei 35 mm Petrischalen je 1,1 ml in jede 35 mm Petrischale pipettiert und der Rest verworfen.
Um bei der folgenden Inkubation die Luftfeuchtigkeit möglicht hoch zu halten und so ein Austrocknen der Kulturen zu verhindern, wurden je zwei Petrischalen, die so angesetzte Methylzellulose – Kulturen enthalten, zusammen mit einer deckellosen 35mm-Petrischale, die Aqua bidest enthält, in eine 94 mm Petrischale mit Deckel gesetzt.
Die so vorbereiteten Methylzellulose–Kulturen wurden jetzt für 2 Wochen bei 37°C, 5% CO2 und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.
Im Anschluß konnten die Kulturen abgelesen werden:
Im Durchlichtmikroskop wurden die entstandenen Kolonien gezählt und nach folgenden Koloniearten unterschieden:
unizentrische Kolonien von Vorläuferzellen der Erythropoese (CFU-E)
multizentrische Kolonien von Vorläuferzellen der Erythropoese (BFU-E)
Granulozyten – Kolonien (CFU-G)
Makrophagen – Kolonien (CFU-M)
Granulozyten – Makrophagen – Kolonien (CFU-GM)
Kolonien, die aus Granulozyten- und Makrophagenvorläuferzellen, sowie aus erythropoetischen Zellen bestehen (GEMM)

4.2.1.2 Details zu einzelnen Arbeitsschritten

4.2.1.2.1. Anreicherung mononukleärer Zellen

Immer wenn bisher oder im folgenden von der Separation mononukeärer Zellen gesprochen wird, wurde die hier beschriebene Methode angewendet:
Das Knochenmark wird, entweder wie entnommen (s. 4.1.1.2) oder mit Kryokonservierungsmitteln und / oder anderen Medien gemischt, verarbeitet:
15 ml Ficoll werden in ein 50 ml Leukosep-Röhrchen auf den Filter gegeben und etwa 30 Sekunden bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Ficoll-Lösung befindet sich jetzt unter dem Filter.
Dann werden 15 ml einer Knochenmark-Zellen–enthaltenden Suspension auf den Filter gegeben und 10 Minuten bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert.
Dadurch setzen sich Zellen mit höherer Dichte, z. B. Erythrozyten, aber auch Zelldetritus ganz unten im Röhrchen ab, während Zellen mit geringerer Dichte, vornehmlich mononukleäre Zellen, oberhalb des Filters bleiben.
Das Leukoseptröhrchen wird immer streng senkrecht gehalten.
Jetzt wird die Zellsuspension, die sich oberhalb des Filters befindet, mit einer sterilen Pipette abgenommen und in ein steriles 50 ml Kunststoffröhrchen gegeben. Das Leukosepröhrchen mit Ficoll und dem abzentrifugierten

Material wird verworfen, die Zellsuspension im 50 ml Kunststoffröhrchen wird mit RPMI bis zum Erreichen der 50 ml Marke aufgefüllt.
Nun wird 10 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Dieses sogenannte „Waschen“ dient dazu, eventuell vorhandene Ficoll-Lösung weitestgehend aus der Zellsuspension zu entfernen.
Das so präparierte Knochenmark wird beschreibend Low Density (LD) – Knochenmark genannt, also Knochenmark geringer Dichte.

4.2.1.2.2. Elimination von adhärenten Zellen

Aus den durch Separation über einem Dichtegradienten angereicherten mononukleären Zellen sollen durch die im folgenden beschriebene Methode v.a. die Monozyten entfernt werden. In der Langzeitkultur würden die Monozyten zwangsläufig zugrunde gehen und dabei ihre zytotoxischen Enzyme freisetzen, was für die Zellen, die nachgewiesen werden sollen, negative Auswirkungen haben kann (persönliche Unterweisung Professor Dörmer, GSF, München).
1-2 x 10^7 mononukleäre Zellen werden in 10 ml PBS plus 10% FCS aufgenommen und in eine Gewebekultur-Petrischale von 90 mm Durchmesser und 15 mm Höhe gegeben und 1 ½ Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert.
Danach werden die Überstände aller Petrischalen mit den nicht adhärenten Zellen in 50 ml Kunststoffröhrchen der Firma Greiner gepoolt, bei Bedarf mit PBS plus 10 % FCS bis zur 50 ml Marke aufgefüllt und 10 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, ebenso die TC-Petrischalen mit den adhärenten Zellen.

4.2.1.2.3. Feeder – Layer aus frischem humanem Knochenmark

4.2.1.2.3.1 Etablieren des Feeder-Layers

Aspirat

Frisches Knochenmark wurde wie entnommen, nicht separiert oder zentrifugiert, 1 : 1 mit PBS gemischt.

Darin wurden die mononuklären Zellen angereichert (s. 4.2.1.2.1.) und das Pellet mittels der Vortex – Maschine verschüttelt. Wenn etwa 4 bis 10 ml frisches Knochenmark so verarbeitet waren, wurden ca. 10 ml MyeloCult – Medium zugegeben. Die Zahl an kernhaltigen Zellen pro Milliliter wurde durch Zählen mit Türk´scher Lösung ermittelt, das genaue Volumen an vorhandener Zellsuspension wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette bestimmt.

In eine Schräghals - Zellkultur – Flasche mit einer Grundfläche von 75 cm^2 wurden 3x10^7 Zellen, in 20 ml MyeloCult – Medium suspensiert, pipettiert.

In eine Schräghals – Zellkultur – Flasche mit einer Grundfläche von 25 cm^2 wurden 1x10^7 Zellen, in 5 ml MyeloCult – Medium suspensiert, pipettiert.

Siebrückstände

Frisch entnommenes Knochenmark wird durch ein Sieb gefiltert, um beispielsweise Knochenbälkchen, die bei der Stanze gelockert und mitaspiriert wurden, aus dem Aspirat zu entfernen. In diesem abgesiebten Material sind ausreichend Stromazellen vorhanden, um daraus einen Feeder-Layer zu ziehen.

Die Siebe wurden mit PBS-Lösung gespült, die Spüllösung aufgefangen und 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets gepoolt und mit 10 ml MyeloCult-Medium gemischt. Ab hier wurde vorgegangen wie bei Feeder-Layer aus Aspirat.

Die Flaschen wurden bei Brutschrank – Bedingungen 2,5 bis maximal 4 Wochen inkubiert, wobei jede Woche ein Mediumwechsel vorgenommen wurde:

Aus der Flasche mit 75 cm^2 Grundfläche wurden nach sieben Tagen 5ml Medium vorsichtig entnommen, ohne mit der Pipettenspitze den Layer, bzw. den Flaschenhals zu berühren. Ebenso vorsichtig wurden 15 ml frisches MyeloCult – Medium langsam auf den Layer getropft, um ihn nicht zu zerstören.
Nach weiteren sieben Tagen wurden 15 ml altes Medium entnommen und durch 15 ml frisches MyeloCult – Medium ersetzt.
Gegebenenfalls wurde nach weiteren sieben Tagen ebenso verfahren.

Aus der Flasche mit 25 cm^2 Grundfläche wurden nach 7 Tagen lediglich 5 ml frisches MyeloCult – Medium zugefügt. Nach weiteren sieben Tagen wurden 5 ml altes Medium der Flasche entnommen und durch 5 ml frisches MyeloCult – Medium ersetzt.

Wichtig ist es, nie das gesamte Medium auszutauschen, da die Knochenmark – Zellen selbst Faktoren produzieren und ins Medium abgeben, die ihr Wachstum begünstigen.

4.2.1.2.3.2 Umsetzen in 35mm – Zellkulturschälchen

Der Feeder – Layer wurde frühestens nach 2,5 Wochen umgesetzt, immer aber erst, wenn er konfluent war.
Es wurde sämtliches Medium entfernt, wobei besonders darauf geachtet wurde, den Layer möglichst nicht mit der Pipettenspitze zu berühren. Das restliche Serum, das aus dem MyeloCult – Medium stammt und noch am Layer haftet, musste weitgehend entfernt werden, damit die Wirkung des später zugegebenen Trypsins nicht geschwächt wird. Zu diesem Zweck wurden auf einen Feeder – Layer in einer 75cm^2 – Flasche 20 ml PBS gegeben, zu einem Feeder – Layer in einer 25 cm^2 – Flasche 10 ml PBS. Nach ca. 10 Minuten wurde das PBS entfernt und verworfen.
Auf den Feeder – Layer in einer 75 cm^2 – Flasche wurden 2,5 ml Trypsin, auf den Feeder – Layer in einer 25 cm^2 - Flasche 1 ml Trypsin vorsichtig aufgetropft und die Flasche dann sanft bewegt, so dass das Trypsin den ganzen Layer bedeckt, der Layer sich bei dieser Manipulation aber nicht als Haut ablöst. Jetzt wurde der Layer mit dem Trypsin ca. 10 bis 25 Minuten bei Brutschrankbedingungen inkubiert, bis die Layer – Zellen im

Durchlicht – Mikroskop rund erscheinen. Dann wurde die Trypsin–Wirkung mit der gleichen Menge FCS gestoppt. Weiter wurde im Wesentlichen so verfahren, wie unter 4.2.1.1.2. beschrieben ist.
Trypsin und FCS wurden durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Erst danach wurden die Zellen bei geschlossener Flasche durch heftiges Schütteln und Klopfen auch mechanisch voneinander getrennt. Dabei wurde darauf geachtet, den Flaschenhals möglichst nicht mit der Suspension zu benetzten, da sich dadurch das Kontaminationsrisiko erhöht hätte. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml Kunststoffröhrchen pipettiert und bis zur 50 ml Marke mit PBS aufgefüllt. Bei Feeder aus Siebrückständen wurde die Suspension vor dem zentrifugieren noch gefiltert. Dann wurde 10 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Durch dieses Vorgehen wurde das Trypsin aus der Zellsuspension weitgehend entfernt.
Jetzt wurden je nach Layerzell-Zahl 5 bis 15 ml MyeloCult-Medium zugegeben, die Zellzahl mittels Zählung mit Türk´scher Lösung bestimmt und das genaue Volumen gemessen. Das Volumen mit einer Zellzahl von $1x10^5$ Zellen wurde mit Myelocult-Medium auf 2 ml aufgefüllt, verschüttelt und in 36 mm TC Petrischalen eingebracht.
Die so bestückten Petrischalen wurden 3 Tage bei Brutschrank-Bedingungen (s. 4.2.1.) inkubiert, bis die Zellen im Durchlicht – Mikroskop gestreckt erschienen und ein konfluenter Layer existierte.
Dann wurden die Pertrischalen mit 16 gray bestrahlt, das bestrahlte Medium abgenommen und verworfen und durch frisches Medium ersetzt.

4.2.1.2.4. Feeder aus der murinen Zelllinie M2 10B4

4.2.1.2.4.1 Etablieren des Feeder-Layers

Als Medium wurde verwendet: RPMI plus L-Glutamin als Fertiglösung plus 10 % FCS plus 1% Penicillin Streptomycin.
Dieses Gemisch wurde bei 7°C im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb einer Woche verbraucht, bzw. eingefroren aufbewahrt.
Die Zellen der murinen Knochenmark-Feeder-Zelllinie M2 10B4 wurden in einer Kryobox im –80 °C – Gefrierschrank eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.
Es wurde ein 2ml – Kryoröhrchen mit M2 10B4 – Zellen im 37°C – Wasserbad aufgetaut und mit 1,5 ml FCS vermischt, um zu verhindern, dass die Zellen agglutinieren. Dann wurden etwa 6 ml RPMI plus Glutamin zugegeben, um das noch vorhandene DMSO zu verdünnen.
Um das DMSO weitgehend zu entfernen, wurde 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde vortex-verschüttelt und mit ca. 5 ml des vorher angesetzten Mediums verdünnt.
Dann wurde mit Trypan – Blau – Zählung die Zellzahl pro Milliliter und mit einer Pipette das genaue Volumen bestimmt.
Das Suspensionsvolumen mit $2x10^6$ Zellen wurde mit Medium auf 10 ml aufgefüllt und in eine Zellkulturflasche mit 25 cm^2 Grundfläche pipettiert.
Diese Flasche wurde 4 Tage bei Brutschrank – Bedingungen inkubiert.

Am 4. Tag wurde entweder ein Medienwechsel vorgenommen, wobei 5 ml altes Medium entnommen und durch 5 ml frisches Medium ersetzt wurden, oder die Zellen wurden in 35 mm Zellkulturschälchen umgesetzt.
Nach ca 8 Tagen wurde gesplittet, d.h. die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Trypsin vereinzelt, die Trypsinwirkung mit FCS gestoppt und Zellzahl und Volumen bestimmt. Dann wurden wieder $2x10^6$ Zellen mit 10 ml Medium vermischt und in eine Zellkulturflasche mit 25 cm^2 Grundfläche eingebracht.

4.2.1.2.4.2 Umsetzten in 35 mm – Zellkulturschälchen

Wie bei anderen Layer–Arten auch, wurden die Zellen mit Trypsin vereinzelt, die Wirkung mit FCS gestoppt, die Zellen gewaschen und mit Türk´scher Lösung gezählt.
Pro 35 mm – Zellkulturschälchen wurden $2x10^5$ Zellen in 2 ml Medium eingesät. Je zwei dieser 35mm – Schälchen wurden mit einem mit Aqua bidest gefüllten, deckellosen 35mm Schälchen in ein 94 mm Schälchen mit Deckel gestellt.
Nach drei bis vier Tagen im Brutschrank, wenn die Zellen im Durchlicht – Mikroskop gestreckt erschienen und der Feeder konfluent war, wurden die Schälchen mit 60 gray bestrahlt, um ein Weiterwachsen des Layers und damit seine Ablösung vom Untergrund zu verhindern. Das bestrahlte Medium wurde entfernt und durch frisches Medium ersetzt, die Schälchen bis zur Weiterbearbeitung im Brutschrank aufbewahrt.
Nun standen die mit Feeder – Layer bestückten Schälchen bereit, mit hämatopoetischen Zellen besät zu werden. Sie waren also bereit für den Recharche, der immer am selben oder am nächsten Tag vorgenommen wurde.

4.2.1.2.5. Feeder aus der humanen Zellinie 88/5

4.2.1.2.5.1 Etablieren

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen der Zellinie 88/5 wurden aufgetaut. In eine Schräghals – Zellkultur – Flasche mit 25 cm^2 Grundfläche wurden $3x10^5$ Zellen in 5ml MyeloCult -Medium eingebracht, in eine Flasche mit 75 cm^2 Grundfläche wurden $1x10^6$ Zellen in 15 ml MyeloCult – Medium eingebracht. Es wurde kein Mediumwechsel vorgenommen. In einer Woche vermehren sich die Zellen um den Faktor 5 bis 10. Sie wurden jetzt nach dieser Woche entweder gesplittet, d.h. mit Hilfe von Trypsin und mechanisch vereinzelt (s. 4.2.1.2.3.2.) und in eine neue Zellkultur – Flasche zur weiteren Vermehrung eingesetzt, oder in 35mm – Zellkulturschälchen umgesetzt.

4.2.1.2.5.2 Umsetzen in 35mm – Zellkulturschälchen

Im wesentlichen wurde vorgegangen wie bei Feeder – Layer aus humanem Knochenmark – Aspirat (4.2.1.2.3.).
Allerdings wurden bei Feeder in einer Zellkultur – Flasche mit einer Grundfläche von 25 cm^2 nur 0,7 ml Trypsin aufgetropft, bei einer Flasche mit 75 cm^2 Grundfläche wurden 2 ml Trypsin aufgetropft. Nachdem die Zellen mit Trypsin gerundet wurden, wurde die Trypsin – Wirkung nicht durch pures FCS gestoppt, sondern es wurde MyeloCult – Medium plus HSS zugegeben, und zwar 5 ml für eine 25 cm^2 – Zellkulturflasche und 8 ml für eine 75 cm^2 – Flasche.
In ein 35mm – Zellkulturschälchen wurden $1x10^5$ Zellen eingebracht und noch am gleichen Tag mit 15 gray bestrahlt. Das bestrahlte Medium wurde entfernt und durch frisches ersetzt.

Der Recharge wurde immer am selben oder am nächsten Tag vorgenommen, die Feeder–Layer–Schälchen wurden bis dahin im Inkubator aufbewahrt.

4.2.1.2.6. Zählen mit Türk`scher Lösung

Um die Zahl der mononukleären Zellen pro Milliliter Zellsuspension zu bestimmen, wurden 25 µl der Zellsuspension mit 475 µl Türk´scher Lösung gemischt und vortex-verschüttelt. In der Zählkammer wurden unter dem Mikroskop 2x16 Quadrate ausgezählt und diese Zellzahl mit 10^5 multipliziert.

4.2.1.2.7. Zählen mit Trypan – Blau

Um das Verhältnis vitaler zu toter Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde eine Probe der frisch vortex-verschüttelten Zellsuspension zu gleichen Teilen mit Trypan-Blau-Lösung gemischt. In einer Zählkammer wurden im Auflichtmikroskop mindestens 100 Zellen in vitale und tote Zellen unterschieden und so der Prozentsatz an vitalen Zellen ermittelt.

4.2.1.3 Vergleich verschiedener Feeder – Layer und verschiedener Zelleinsaaten hämatopoetischer Zellen in der Langzeitkultur mit DMSO – gefrorenem Knochenmark.

8 ml gesundes Knochenmark wurden 1 : 1 gemischt mit DMSO in 8 2ml-Kryoröhrchen kontrolliert (s.4.2.1.1.1.) eingefroren.

1 ml des gleichen Knochenmarks wurde 1 : 1 gemischt mit NaCl – Lösung zeitgleich in einem gleichen Kryoröhrchen kontrolliert mitgefroren.

Alle gefrorenen Kryoröhrchen wurden bei –80°C in flüssigem Stickstoff 40 Tage lang aufbewahrt.

Aus der murinen kryokonservierten Zellinie M2 10B4, die freundlicherweise von der GSF-München zur Verfügung gestellt wurde, wurde 5 Tage lang ein Layer etabliert, der dann in 35 mm Zellkultur – Petrischalen umgesetzt wurde (2,3 x 10^5 Zellen pro Petrischale) und nach drei Tagen mit 60 gray bestrahlt wurde.

Aus Siebrückständen von frischem humanen Knochenmark wurde 25 Tage lang ein Layer etabliert, der dann in 35 mm – Zellkulturschälchen umgesetzt wurde (3,3 x 10^5 Zellen pro Petrischale), hier 2 Tage im Brutschrank inkubiert wurde und dann mit 15 gray bestrahlt wurde.

Beide Layer wurden am gleichen Tag bestrahlt.

Am Folgetag wurde der „Recharge“ vorgenommen:

Das mit DMSO gefrorene Knochenmark wurde bei 37°C aufgetaut. Über eimem Ficoll-Dichte-Gradienten wurden die mononukleären Zellen angereichert (s.4.2.1.2.1.) und daraus die adhärenten Zellen eliminiert (s. 4.2.1.2.2.).

Auf beide Feeder – Layer wurden einmal 3,3x10^5, einmal 6,6x10^5 dieser separierten Zellen aufgebracht. Außerdem wurde je ein Schälchen mit Feeder – Layer ohne Recharge als Kontrolle mitgeführt.

Nach 5 Wochen Inkubation bei Brutschrank-Bedingungen und wöchentlichem Mediumwechsel (s. 4.2.1.1.2.) wurden die Zellen in eine Methylzellulose-Kurzzeitkultur umgesetzt (s. 4.2.1.1.3.). Dabei wurde mit Überstand und Layer getrennt verfahren:
Die 5 Wochen inkubierten Schälchen wurden im Durchlichtmikroskop auf ihren ungefähren Gehalt an lebenden Zellen hin beurteilt. Danach entschied sich der Grad der Verdünnung, also welche Bruchteile der Zellen aus dem Überstand in je 2 ml Methylzellulose eingebracht wurden. Von den Layerzellen wurde immer 1/5 in 4ml Methylzellulose eingebracht. Das große Volumen an Methylzellulose hat hier den Vorteil, daß der „Hintergrund", gebildet durch die Feederlayer-Zellen selbst, weniger stark ist. Er erschwert die mikroskopische Beurteilung der Kurzzeitkulturen nach 2 Wochen.
Je 1,1 ml Methylzellulose-Zellsuspension-Gemisch werden in eine 35mm-Petrischale eingebracht. Aus dem Methylzellulose-Zellsuspension-Gemisch mit Überstandzellen wurden je zwei Petrischalen befüllt, aus dem mit Layerzellen wurden je 3 Petrischalen befüllt.
Nach zwei Wochen wurden die Petrischalen im Durchlichtmikroskop abgelesen.

4.2.1.4 Vergleich verschiedener Feeder – Layer und verschiedener Einfriermedien in der Langzeitkultur mit kryokonserviertem Knochenmark.

Knochenmark eines gesunden Spenders wurde nach folgendem Schema, jeweils 1 : 1 mit dem entsprechenden Einfriermedium gemischt, kontrolliert eingefroren:

Je 2x:
1ml mit Trehalose 2M ohne Insulin
1ml mit Trehalose 2M plus 25 Mikroliter Insulin
1ml mit Trehalose 1M ohne Insulin
1ml mit Trehalose 1M plus 25 Mikroliter Insulin
1ml mit Trehalose 0,5M ohne Insulin
1ml mit Trehalose 0,5M plus 25 Mikroliter Insulin

1x:

1ml mit NaCl (als Kontrolle)
1ml mit 10%igem DMSO

Jeder ml Knochenmark enthielt vor dem Einfrieren $1{,}46 \times 10^7$ mononukleäre Zellen.

Es wurden 3 verschiede Feeder – Layer verglichen:

ein Feeder aus frischem Aspirat
ein Feeder aus der murinen Zelllinie M2 10B4
ein Feeder aus der humanen Zelllinie 88/5

Von jedem Feeder – Layer wurde genügend etabliert, um je 8 35mm – Zellkulturschälchen zu besäen.
Der Recharge wurde auf allen Feeder – Layer – Schälchen am gleichen Tag vorgenommen.

Das kryokonservierte Knochenmark wurde aufgetaut, über einem Ficoll-Dichtegradienten zentrifugiert und anschließend gewaschen. Nach Elimination der adhärenten Zellen wurde für jedes Pellet, also für jedes Einfriermedium die Zahl an lebenden, mononukleären Zellen mit Hilfe von Türk´scher Lösung und Trypan – Blau ermittelt.

Jedes Pellet wurde zu gleichen Teilen auf die drei verschiedenen Feeder – Layer aufgebracht. Daraus ergab sich die in E2, Tabelle 1 dargestellte Zelleinsaat.
Die so bestückten 35mm – Schälchen wurden je zu zweit zusammen mit einem deckellosen Aqua bidest – gefüllten 35mm – Schälchen in ein 94mm–Schälchen mit Deckel gesetzt.
Sie wurden so 5 Wochen lang bei Brutschrankbedingungen inkubiert, und dann in eine Methylzellulose – Kurzzeitkulturen umgesetzt, die nach weiteren 2 Wochen im Brutschrank im Durchlicht – Mikroskop abgelesen werden konnten.

4.2.1.5 Vergleich von DMSO- und Trehalose-frostgeschützten Knochenmarkzellen in der Langzeitkultur

Knochenmark, das einem Spender in einer Sitzung entnommen wurde, wurde aufgeteilt und 1:1 mit ein-molarer Trehalose – Lösung ohne Insulin – Zusatz bzw. mit DMSO, bzw. mit NaCl-Lsg kontrolliert eingefroren und bei ca. - 80°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.
Dann wurde aus frisch entnommenem humanem Knochenmark eines gesunden Spenders über zwei bis drei Wochen ein Feeder – Layer herangezogen (s. Methodik Punkt 4.2.2.2.3.1.).
Der konfluente Feeder – Layer wurde in 35mm – Gewebekultur – Petrischalen umgesetzt (s. Punkt 4.2.2.2.3.2.) und nach drei Tagen mit 16 Gray bestrahlt.
Jetzt wurde das kryokonservierte Knochenmark aus dem Stickstoff genommen, im Wasserbad aufgetaut und mit 5ml RPMI pro ml Knochenmark verdünnt. Im folgenden wurden die mononukleären Zellen über einem Ficoll – Dichtegradienten angereichert und die adhärenten Zellen entfernt. Die so angereicherten Zellen wurden mit Türk´scher Lösung gezählt und 5 x 10^5 Zellen in 2ml Myelocult – Medium auf jede mit Feeder – Layer bestückte 35mm Petrischale gegeben. Je zwei dieser mit LTC bestückten Petrischalen wurden mit einer deckellosen mit Aqua bidest gefüllten 35 mm Petrischale in eine 94mm Petrischale mit Deckel gesetzt.
Die so vorbereiteten LTC wurden 5 Wochen lang bei 37°C, 5% CO2 und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.
Währenddessen wurde alle sieben Tage je ein ml Medium pro Schälchen entnommen und durch frisches Myelocult – Medium ersetzt.
Nach Ablauf der fünf Wochen wurde die adhärente und die nicht – adhärente Fraktion getrennt in Methylzellulose umgesetzt, wobei von der adhärenten Fraktion pauschal die Hälfte der vorhandenen Zellen in 4 ml Methylzellulose gegeben wurde, während von der nicht – adhärenten Fraktion verschiedene Verdünnungen angesetzt wurden.
Wieder wurden zwei Kulturen – enthaltende 35mm – Petrischalen zusammen mit einer Wasserschale in eine 94mm Petrischale gesetzt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten und so ein Austrocknen der Kulturen zu vermeiden.

Nach zwei Wochen Inkubation bei 37° und 5% CO2 wurden die entstandenen Kolonien im Durchlichtmikroskop bestimmt und gezählt.

Bei den 3 unabhängigen Experimenten wurde folgendermassen vorgegangen:

Experiment 1:

Es wurden jeweils 3 ml KM 1:1 mit DMSO bzw. Trehalose 1M kontrolliert eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dieses KM wurde für den Recharge aufgetaut und mit Hilfe von Türk´scher Lösung und Trypan-Blau die Gesamtzahl an lebenden Zellen bestimmt.

Pro mit Feeder-Layer vorbereiteter 35mm-Petrischale wurden $2{,}5x10^5$ lebende Zellen eingesetzt und die Kultur 5 Wochen lang erhalten. In dieser 5-Wochen-Kultur wurde ein 2-fach-Ansatz gefahren.

Im Methylzellulose-Assay wurde ein 1-fach Ansatz gefahren, mit den Verdünnungen ½ für den Layer und ½, 1/10 und 1/50 für den Überstand.

Experiment 2:

Es wurden 3x900µl = 2,7 ml natives Knochenmark mit DMSO und 4x900µl = 3,6ml natives Knochenmark mit Trehalose kontrolliert gefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, bis es für den Recharge verwendet wurde.

In der 5-Wochen-Kultur wurde ein 6-fach-Ansatz gefahren, in der Methylzellulose-Kultur ein Doppel –Ansatz mit der Verdünnung ½ .

Experiment 3:

Es wurden jeweils 2 ml Knochenmark 1:1 mit DMSO bzw. Trehalose 1M kontrolliert eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dieses Knochenmark wurde für den Recharge aufgetaut und mit Hilfe von Türk´scher Lösung und Trypan-Blau die Gesamtzahl an lebenden Zellen bestimmt.

Pro mit Feeder-Layer vorbereiteter 35mm-Petrischale wurden $5x10^5$ lebende Zellen eingesetzt und die Kultur 5 Wochen lang erhalten. In dieser 5-Wochen-Kultur wurde ein 3-fach-Ansatz gefahren.

Im Methylzellulose-Assay wurde ein 1-fach Ansatz gefahren, mit der Verdünnungen ½.

4.2.2 Radioimmunassay

Als Maß für die Komplementaktivierung wurde der Gehalt an C3a im Knochenmark gemessen, wie im folgenden beschrieben wird:

Es wurde der Radioimmunoassay-Kit für C3a-desArg der Firma Biotrak entsprechend der Gebrauchsanleitung verwendet:

Eine festgelegte Menge Tracer, also radioaktiv markiertes C3a, wird mit den zu testenden Proben und parallel, um eine Standardkurve zu erstellen, mit Proben bekanntem C3a – Gehaltes gemischt. Dann werden alle Probe–Tacer–Gemische mit einer festgelegten Menge Anti – C3a – Hasenserum gemischt. Der Tracer und das in den Proben enthaltene C3a konkurrieren jetzt um die Anti-C3a-Hasenantikörper. Um den Komplex C3a-Anti-C3a zu vergrößern, werden nun noch Ziege-Anti-Hase-Antikörper in ausreichender Menge zugegeben. Der Komplex C3a-Anti-C3a-Anit-Hase ist schwer genug, um sich bei Zentrifugation mit 2000xg über 10 Minuten als Pellet am

Boden abzusetzten. Der Tracer, der auf Grund der Konkurrenz mit dem in der Probe enthaltenen C3a keine Komplexe mit den Anitkörpern gebildet hat, ist klein und leicht und schwebt auch nach der Zentrifugation im Überstand. Der Überstand wird abgekippt und die Wände der Reagenzröhrchen sorgfältig mit Wattestäbchen getrocknet, um alle Reste des radioaktiven Überstands zu entfernen.
Im Pellet befindet sich jetzt also um so weniger Tracer, je mehr C3a in der Probe enthalten war, da ja Tracer und C3a um die Komplexbildung konkurriert haben. Je geringer also die Radioaktivität des Pellets, desto größer die C3a-Konzentration der Probe.
Die Radioaktivität der Pellets wird gemessen, und an Hand der Proben mit bekannter C3a-Konzentration eine Standardkurve erstellt. An dieser Standardkurve lässt sich die C3a-Konzentration der zu testenden Proben ablesen.

4.2.2.1 Ermittlung einer für den Assay geeigneten Verdünnung

Der Radioimmunoassay-Kit der Firma Biotrak für C3a liefert nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich valide Ergebnisse. Da bisher keine Daten vorlagen, die eine Prognose über die ungefähre C3a-Konzentration in mit Trehalose bzw. DMSO kryokonservierten Knochenmark erlauben würden, solllte in diesem Versuch herausgefunden werden, wie hoch das Knochenmark für den Assay verdünnt werden muss.
Durchführung:
Das Knochenmark eines an CML erkrankten Spenders wurde je 1:1 mit DMSO, Trehalose bzw. NaCl gemischt und nach dem unter 4.2.1.1.1. beschriebenen Verfahren eingefroren. Es wurde 2 Jahre lang in flüssigem Stickstoff bei –80°C aufbewahrt.
Diese Gemische aus Knochenmark und Kryoreagenz wurden aufgetaut und sowohl unverdünnt, wie auch 1:10 und 1:30 mit PBS verdünnt deren C3a-Konzentration mit Hilfe des Radioimmunoassays wie oben beschrieben bestimmt.

4.2.2.2 Vergleich von mit DMSO oder Trehalose tiefgefrorenen Knochenmarkzellen bezüglich einer Komplementaktivierung

Knochenmark von fünf verschiedenen Spendern wurde 1:1 mit DMSO bzw. mit Trehalose 1M nach dem unter 4.2.1.1.1. beschriebenen Verfahren tiefgefroren und mindestens ein Jahr in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.
Diese Gemische aus Knochenmark und Kryoreagens wurden aufgetaut und in ihnen mit Hilfe des Radioimmunoassays wie oben beschrieben die C3a-Konzentration bestimmt. Für diesen Versuch wurde für alle Ansätze eine 1:10 – Verdünnung gewählt.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Feeder-Layer

In dem unter 4.2.1.3 beschriebenen Vergleich von primär humanem Feeder-Layer und Feeder-Layer aus der murinen Zelllinie M2 10B4 in der LTC mit DMSO-kryokonserviertem KM zeigte sich, dass im Hinblick auf die Zahl der vitalen Zellen nach 5 Wochen Kultur der primär humane Feeder-Layer in allen Ansätzen bessere Ergebnisse als der Feeder-Layer aus der Zelllinie M2 10B4 erbrachte. Je nach eingesetzter Zellzahl waren die Ergebnisse mit primären humanem Layer um einen Faktor von 1,26 bzw. 4,95 besser in Bezug auf die nicht-adhärenten Zellen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei den vitalen adhärenten Zellen (korrigiert durch die Anzahl der als Kontrolle dienenden Layer-Zellen) mit einem Faktor von 2,46, bzw. 1,33 (s. Tabelle 1, Spalte 3, „Vitale Zellen“).
Unter Berücksichtigung aller Ansätze zeigten Zellen, die auf primär humanem Layer kultiviert wurden, ein bei weitem höheres Koloniebildungs-Potential, als Zellen, die auf M2 10B4-Layer kultiviert wurden (Je nach eingesetzter Zellzahl um einen Faktor von 9,3 bzw. 10,04). Ein weiteres Ergebnis dieser Versuchsreihe war in allen Ansätzen, dass Überstandszellen ein um mindestens den Faktor 1,48 höheren Anteil an klonogenen Zellen enthielten als die hämatopoetischen Zellen der adhärenten Fraktion. (Siehe Tabelle 1, letzte Spalte, „Klonogenität, gemittelt: eingebrachte Zellen / Kolonie“).
Die auf primär humanem Feeder-Layer kultivierten Zellen bildeten im MC-Assay mehr Kolonien als die auf M2 10B4 Feeder Layer kultivierten Zellen. Das gilt für alle unterschiedlichen Koloniearten (CFU-E, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M und CFU-GM; s. Tabelle 3). Dies liess sich sowohl für Zellen der adhärenten (Faktor mindestens 18) als auch der nicht-adhärenten Fraktion (Faktor mindestens 7) zeigen (Abb. 1). Die Gesamtzahl der Kolonien aus Kulturen auf primär humanem Feeder-Layer war mindestens um den Faktor 11 grösser als die der Kulturen auf M2 10B4 Feeder Layer (Abb. 1). Kolonien der roten Reihe wuchsen auf humanem wesentlich besser als auf murinem Layer (Faktor 59). Etwas weniger ausgeprägt, aber immer noch deutlich, war dieser Effekt auch bei der weissen Reihe zu beobachten (Faktor 10; s. Tabelle 2). Zugrundegelegt wurden hier beispielhaft die Ergebnisse der nicht-adhärenten Fraktion (=Überstand) mit der Verdünnung 1/10 und der adhärenten Fraktion (Layer) mit der Verdünnung 1/5. Die Einzelergebnisse sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Um die Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungen besser vergleichen zu können, wurden die absoluten Koloniezahlen mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Werte stellen also die Koloniezahlen dar, die sich ergeben hätten, wenn man alle zur Verfügung stehenden Zellen tatsächlich in die Methylcellulose-Kultur eingebracht hätte. Sie sind in Tabelle 2 in den Spalten ‚CFU’s hochgerechnet’ dargestellt.

Der Vergleich von primär humanen, 88/5 und M2 10B4 Feeder-Layer mit Trehalose- oder mit DMSO-kryokonserviertem KM (siehe 4.2.1.4) führte zu folgenden Ergebnissen in der LTC:

Kulturen auf primär humanem Feeder-Layer erbrachten in allen Ansätzen sowohl mit DMSO-, wie auch mit Trehalose-kryokonserviertem Knochenmark die deutlich besten Ergebnisse.
Aus Zellen der LTC im MC-Assay gezüchtete Kolonien wurden differenziert nach CFU-E, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M and CFU-GM. Unabhängig von der Differenzierung konnte bei Zellen, die zunächst in der LTC auf primär humanem Feeder gezogen wurden, bessere Ergebnisse erzielt werden als bei Zellen, die auf 88/5-Feeder-Layer bzw. M2 10B4 Feeder-Layer generiert wurden. Die Details sind in Tabelle 4 dargestellt.
Unabhängig von der Kryokonservierung mit DMSO oder Trehalose konnte bei einer 1/50-Verdünnung im MC-Assay, die in allen Ansätzen durchgeführt wurde, eine im Median 10-fach höhere Zahl an roten Kolonien aus Kulturen mit primär humanem Feeder-Layer angezüchtet werden als aus Kulturen aus der humanen Zelllinie 88/5. Kulturen mit der murinen Zelllinie M2 10B4 erbrachten die bei weitem schlechtesten Ergebnisse (s. Abbildung 2). Die absoluten Koloniezahlen aller Verdünnungen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Auch bezüglich der weißen Kolonien ergab der primär humane Feeder-Layer in allen Ansätzen sowohl mit DMSO- als auch mit Trehalose-kryokonservierten Zellen die besten Ergebnisse. Allerdings war der Unterschied gegenüber Zellen, die auf der humanen Zelllinie 88/5 angezüchtet wurden, weniger ausgeprägt. Zellen, die auf der murinen Zellinie M2 10B4 generiert wurden, erbrachten auch hier die mit Abstand schlechtesten Ergebnisse (s. Abbildung 3).
Am ausgeprägtesten zeigte sich die Überlegenheit des primär humanen Feeder-Layer gegenüber den 88/5 und M2 10B4 - Layern in dem Ansatz mit DMSO-kryokonservierten Zellen. Hierbei konnten Kolonien der roten Zellreihe ausschliesslich nur von Zellen generiert werden, die auf primär humanem Feeder angezüchtet waren. Darüberhinaus führten Kulturen auf primär humanem Feeder-Layer zu 103,33 x mehr Kolonien der weissen Zellreihe als Kulturen auf 88/5-Feeder-Layer und 62x mehr Kolonien als Kulturen auf M2 10B4-Feeder-Layer.

4.3.1.1 **Recharge**

Mit Bezug zur optimalen Zellzahl für die Einsaat auf den Feeder-Layer bei Beginn der LTC (siehe 4.2.1.3) konnten keine einheitlichen Ergebnisse für die unterschiedlichen Layer gewonnen werden.
Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Koloniezahlen im anschliessenden MC-Assay um den Verdünnungsfaktor korrigiert und somit auf eine theoretische Einsaat in die MC von 100% der zur Verfügung stehenden Zellen hochgerechnet.
Einzelergebnisse sind in Tabelle 2, Spalte 5 (CFU´s, hochgerechnet, gemittelt) dargestellt.

Für Kulturen auf M2 10B4-Feeder-Layer erbrachte die höhere Zelleinsaat auf den Feeder-Layer für Kolonien aller Zellreihen im anschliessenden MC-Assay proportional mehr Kolonien.
Entsprechend der Verdünnung im MC-Assay auf 100% hochgerechnet ergaben Kulturen mit $6{,}6x10^5$ Rechargezellen insgesamt (Kolonien aus Überstand- und Layerzellen) 3,5 rote Kolonien, Kulturen mit $3{,}3x10^5$ Rechargezellen dagegen nur 0,83 rote Kolonien. Auch unter Berücksichtigung der doppelten zur Verfügung stehenden Zellzahl in den Kulturen mit $6{,}6x10^5$ Rechargezellen zeigen die Kulturen mit höherer Rechargezellzahl bessere Ergebnisse (0,83 rote Kolonien x 2 = 1,66 rote Kolonien < 3,5 rote Kolonien).
Ein ähnliches Bild liess sich bei der Bildung von weissen Kolonien beobachten. Kulturen mit $6{,}6x10^5$ Rechargezellen ergaben insgesamt 331,6 weiße Kolonien, während Kulturen mit $3{,}3x10^5$ Rechargezellen nur 64,8 weiße Kolonien erbrachten. Diese Tendenz blieb auch nach rechnerischer Korrektur der doppelten zur Verfügung stehenden Zellzahl in den Kulturen mit $6{,}6x10^5$ Rechargezellen erhalten (64,8 weiße Kolonien x 2 = 129,6 weiße Kolonien < 331,6 weiße Kolonien).

Für Kulturen auf primär humanem Feeder-Layer liessen sich keine eindeutigen Ergebnisse mit Bezug zur optimalen Zelleinsaat im MC-Assay erzielen.
Für Kolonien der roten Zellreihe wurden mit beiden Rechargezellzahlen vergleichbare Ergebnisse erzielt, während für Kolonien der weißen Zellreihe die geringere Rechargezellzahl zu etwas besseren Ergebnissen führte. Im Einzelnen konnten mit $6{,}6x10^5$ Rechargezellen insgesamt 243,2 rote Kolonien und mit $3{,}3x10^5$ Rechargezellen 131 rote Kolonien im MC-Assay gezüchtet werden. Nach rechnerischerer Korrektur der doppelten zur Verfügung stehenden Zellzahl in den Kulturen mit $6{,}6x10^5$ Rechargezellen zeigt sich bezüglich der Kolonien der roten Reihe ein vergleichbares Ergebnis gegenüber der Einsaat von nur $3{,}3x10^5$ Zellen (131 rote Kolonien x 2 = 262 rote Kolonien verglichen mit 243,2 roten Kolonien).
Kulturen gezogen aus $6{,}6x10^5$ Rechargezellen führten zu insgesamt 1559,8 weißen Kolonien, Kulturen mit $3{,}3x10^5$ Rechargezellen ergaben 944,8 weiße Kolonien. Berücksichtigt man die doppelte zur Verfügung stehende Zellmenge in den Kulturen mit $6{,}6x10^5$ Rechargezellen, so konnte durch die geringere Rechargezellzahl ein geringfügig besseres Ergebnisss erzielt werden (944,8 weiße Kolonien x 2 = 1889,6 weiße Kolonien > 1559,8 weiße Kolonien).
Zusammengefasst, liess sich bei diesem Versuch keine eindeutige Überlegenheit einer der untersuchten Recharge-Zellzahlen nachweisen.

4.3.1.2 Trehalose-Konzentrationen

Der unter 4.2.1.4 beschriebene Vergleich verschiedener Trehalose-Konzentrationen zeigte für die verschiedenen Feeder Layer unterschiedliche Ergebnisse:

Die Kulturen mit 1 und 2 M Trehalose gefrorenem Knochenmark ergaben insgesamt etwas bessere Ergebnisse als die Kulturen mit 0,5 M Trehalose gefrorenem Knochenmark. Das gilt in besonderem Maße für Kulturen auf primär humanem Feeder-Layer.

Im folgenden wurden jeweils die Ergebnisse der 1/50-Verdünnung im MC-Assay zugrunde gelegt. Die Ergebnisse wurden mit 50 multipliziert und so auf eine theoretische Einsaat von 100% der zur Verfügung stehenden Zellen in den MC-Assay hochgerechnet (s. Tabelle 5). Die absoluten Koloniezahlen sind in Tabelle 4 nach CFU-E, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M and CFU-GM unterschieden dargestellt.

Insgesamt ergaben von den Kulturen auf primär humanem Feeder-Layer die Ansätze mit 1M bzw. mit 2M Trehalose etwas bessere Ergebnisse als die Ansätze mit 0,5M Trehalose. Das gilt sowohl für Ansätze mit und als auch für Ansätze ohne Insulinzusatz.
Die besten Ergebnisse bezüglich der roten Kolonien zeigte in diesem Versuch auf primär humanem Feeder-Layer 1M Trehalose. Die Kulturen mit 1M Trehalose ohne Insulinzusatz erbrachten eine geringfügig höhere Anzahl an roten Kolonien, als die Kulturen mit 1M Trehalose mit Insulinzusatz (Faktor 1,11). 1M Trehalose ohne Insulinzusatz erbrachte in diesem Versuch das 1,33-fache bzw. das 1,53-fache an roten Kolonien als die 2M bzw. 0,5M Trehalose ohne Insulinzusatz. 1M Trehalose mit Insulinzusatz zeigte in diesem Versuch auf primär humanem Feeder-Layer eine 2,57–fach bzw. 3,6–fach höhere Zahl an roten Kolonien als 2M Trehalose mit Insulinzusatz bzw. 0,5M Trehalose mit Insulinzusatz.
Zusammengefasst zeigte in den Ansätzen auf primär humanem Feeder-Layer im Hinblick auf die roten Kolonien 1M Trehalose die besten Ergebnisse. Ansätze mit 2M Trehalose brachten nur geringfügig bessere Ergebnisse als 0,5M Trehalose (Faktor 1,15 ohne Insulinzusatz bzw. Faktor 1,4 mit Insulinzusatz).
Nimmt man die weissen Kolonien als Grundlage, so ergab in diesem Versuch mit Kulturen auf primär humanem Feeder-Layer 1M Trehalose mit Insulinzusatz die besten Ergebnisse (2200 weisse Kolonien), gefolgt von 2M Trehalose ohne Insulinzusatz (1975 weisse Kolonien). Die Ansätze mit 0,5M Trehalose mit und ohne Insulinzusatz brachten in diesem Versuch die geringste Anzahl an weissen Kolonien hervor (1000 bzw. 1325 weisse Kolonien).

Bei Kulturen auf Feeder-Layer aus der 88/5 Zellinie zeigte sich für die roten Kolonien kein einheitliches Ergebnis. Hier muß berücksichtigt werden, daß die geringen Koloniezahlen die Aussagekraft dieses Versuchsteils erheblich einschränken: Wurde kein Insulin zugegeben, so zeigten 1M und 2M Trehalose vergleichbare Resultate (Unterschiedsfaktor 1,0), während Ansätze mit 0,5M Trehalose um die Hälfte weniger

rote Kolonien hervorbrachten. Wurde dagegen Insulin zugegeben, erbrachte der Ansatz mit 0,5M Trehalose doppelt so viele rote Kolonien wie der Ansatz mit 2M Trehalose. Der Ansatz mit 1M Trehalose mit Insulinzusatz auf 88/5-Feeder konnte auf Grund einer Pilzkontamination nicht beurteilt werden.
Bezüglich der weißen Kolonien ergibt sich ebenfalls kein einheitliches Ergebnis: Wurde kein Insulin zugegeben, so ergab 0,5M Trehalose ohne Insulin die besten Ergebnisse: Ansätze mit 0,5M Trehalose erbrachten 1,14 x soviele weisse Kolonien wie Ansätze mit 2M Trehalose und 1,55 x soviele weisse Kolonien wie Ansätze mit 1M Trehalose. Wurde dagegen Insulin zugegeben, so erbrachten 0,5M und 2M Trehalose vergleichbare Ergebnisse (Unterschiedsfaktor 1,04). 1M Trehalose mit Insulinzusatz auf 88/5-Feeder konnte auf Grund der Pilzkontamination nicht beurteilt werden.

Die insgesamt sehr geringen Koloniezahlen aus Kulturen auf Feeder-Layer aus der M2 10B4 Zellinie (s. Tabelle 4) schränken die Aussagekraft dieses Versuchsteils sehr ein und lassen daher einen Vergleich der verschiedenen Trehalosekonzentrationen bezüglich ihres kryoprotektiven Potentials nicht zu.

4.3.1.3 Insulin-Zusatz zur Trehalose-Lösung

Insgesamt ergibt der unter 4.2.1.4 beschriebene Versuch keinen deutlichen Hinweis darauf, dass Insulinzugabe das kryoprotektive Potential von Trehalose erhöhen kann.
Einzelheiten sind aus Tabelle 5 und Abbildung 2 und 3 ersichtlich.
Die absoluten Koloniezahlen, unterschieden nach CFU-E, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M and CFU-GM, sind in Tabelle 4 dargestellt.
Für die verschiedenen Feeder-Layer ergaben sich im einzelnen folgende Ergebnisse:
In den Kulturen auf primär humanem Feeder-Layer ergaben in allen Ansätzen die Kulturen mit Knochenmark ohne Insulinzusatz mehr rote Kolonien als die Kulturen mit Knochenmark mit Insulinzusatz (Faktor 1,11; 2,14; 2,6). Bezüglich der weißen Kolonien zeigten die Ansätze mit 2M und 0,5 M Trehalose ohne Insulinzusatz ein 1,27 bzw. 1,33-fach besseres Kolonieoutcome als die mit Insulinzusatz. Kulturen aus mit Trehalose 1M gefrorenem Knochenmark mit Insulinzusatz ergaben dagegen etwas mehr weisse Kolonien (Faktor 1,16) als jene ohne Insulinzusatz.
Die Ansätze auf 88/5 Feeder Layer mit 2M Trehalose mit und ohne Insulinzusatz ergaben die gleiche Anzahl an roten Kolonien. Die Ansätze mit 0,5M Trehalose mit Insulinzusatz erbrachten 4 x mehr rote Kolonien als die Ansätze mit 0,5M Trehalose ohne Insulinzusatz. Im Hinblick auf die weißen Kolonien ergaben sich für 2M Trehalose mit und ohne Insulin vergleichbare Ergebnisse (Unterschiedsfaktor 1,04). Der Ansatz mit 0,5 M Trehalose ohne Insulinzusatz zeigte eine geringfügig höhere Zahl an weissen Kolonien als der mit Insulinzusatz (Faktor 1,14). Der Ansatz mit 1M Trehalose mit Insulinzusatz auf 88/5-Feeder war auf Grund einer Pilzkontamination nicht zu beurteilen.
Auf Grund der geringen Koloniezahlen sind die Ergebnisse der Versuche auf M2 10B4 Feeder Layer nur sehr eingeschränkt beurteilbar. Insgesamt zeigt sich aber auch hier kein deutlicher Hinweis auf eine Verbesserung der Kryoprotektion durch Insulinzusatz.

Tabelle 1: Vergleich verschiedener Feeder – Layer und verschiedener Recharge-Zellzahlen in der Langzeitkultur mit DMSO – gefrorenem Knochenmark.
Verglichen wird die Gesamtzahl der Kolonien, die nach 2 Wochen Methylzellulose-Kultur abgelesen wurden. Es wurde darüberhinaus berechnet, auf wieviele in die MC eingebrachte Zellen eine teilungsfähige Zelle kommt. Daraus läßt sich ablesen, wieviele der die 5-Wochen-Kultur überlebenden Zellen klonogen sind und so als Kandidaten für LTCIC`s gewertet werden können.
Dieses Koloniebildungs-Potential der in die MC eingebrachten Zellen wurde für die verschiedenen Verdünnungen getrennt berechnet.
Des weiteren wurde das Koloniebildungs-Potential der unterschiedlichen Verdünnungen gemittelt, um die verschiedenen LTC-Ansätze auch auf diesen Aspekt hin besser vergleichen zu können.

Layer + Recharge-Zellzahl	Überstand / Layer	Vitale Zellen	Ver-dünnung	Kolonien (CFU´s) gesamt	Klonogenität: eingebrachte Zellen / Kolonie	Klono-genität, gemittelt: eingebrachte Zellen / Kolonie
primär human + 3,3 x 10^5	Überstand	2,12 x 10^5	1/5	94,5	448,68	375,45
			1/10	77,5	273,90	
			1/50	10,5	403,81	
	Layer	6 x 10^5	1/5	97	556,70	556,70
primär human + 6,6 x 10^5	Überstand	3,96 x 10^5	1/10	98,5	402,03	356,65
			1/20	54,5	363,30	
			1/100	13	304,62	
	Layer	9,44 x 10^5	1/5	135,7	905,6	905,6
primär human, Kontrolle	Überstand + Layer	1,52 x 10^5	1/5	0	0	0
M2 10B4 + 3,3 x 10^5	Überstand	1,68 x 10^5	1/5	11,5	2921,74	2893,91
			1/10	7	2400,00	
			1/50	1	3360,00	
	Layer	2,68 x 10^5	1/5	1,3	5846,15	5846,15
M2 10B4 + 6,6 x 10^5	Überstand	0,8 x 10^5	1/10	13	615,38	348,85
			1/20	14	285,71	
			1/100	5,5	145,45	
	Layer	6,8 x 10^5	1/5	7,3	12328,77	12328,77
M2 10B4, Kontrolle	Überstand + Layer	0,86 x 10^5	1/5	0	0	0

Tabelle 2: Vergleich verschiedener Feeder–Layer und verschiedener Recharge-Zellzahlen in der Langzeitkultur mit DMSO – gefrorenem Knochenmark.
Um die Koloniezahlen der verschiedenen Verdünnungen vergleichen zu können, wurden die Koloniezahlen mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Layer + Rechargezellzahl	Verdünnung aus dem Überstand /Layer	CFU´s		CFU´s hochgerechnet		CFU´s hochgerechnet, gemittelt		CFU´s hochgerechnet, gemittelt, gesamt
		rot	weiß	rot	weiß	rot	Weiß	
Primär human, Kontrolle	Layer: 1/5	0	0	0	0	0	0	0
primär human + $3{,}3 \times 10^5$	Ü: 1/5	7,5	87	37,5	435	17,5	573,3	1075,8
	Ü: 1/10	1,5	76	15	760			
	Ü: 1/50	0	10,5	0	525			
	L: 1/5	22,7	74,3	113,5	371,5	113,5	371,5	
primär human + $6{,}6 \times 10^5$	Ü: 1/10	7,5	91	75	910	61,7	1063,3	1803,0
	Ü: 1/20	5,5	49	110	980			
	Ü: 1/100	0	13	0	1300			
	L: 1/5	36,3	99,3	181,5	496,5	181,5	496,5	
M2 10B4, Kontrolle	L: 1/5	0	0	0	0	0	0	0
M2 10B4 + $3{,}3 \times 10^5$	Ü: 1/5	0,5	11	2,5	55	0,83	58,3	65,63
	Ü: 1/10	0	7	0	70			
	Ü: 1/50	0	1	0	50			
	L: 1/5	0	1,3	0	6,5	0	6,5	
M2 10B4 + $6{,}6 \times 10^5$	Ü: 1/10	0	13	0	130	0	320	335,1
	Ü: 1/20	0	14	0	280			
	Ü: 1/100	0	5,5	0	550			
	L: 1/5	0,7	6,6	3,5	11,6	3,5	11,6	

Tabelle 3: Vergleich verschiedener Feeder–Layer und verschiedener Recharge-Zellzahlen in der Langzeitkultur mit DMSO – gefrorenem Knochenmark.
Verglichen wird die Anzahl der Kolonien, die nach 2 Wochen Methylzellulose-Kultur abgelesen wurden. Die Kolonien werden unterschieden in CFU-E, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M, CFU-GM.

Feeder-Layer + Recharge-Zellzahl	Überstand / Layer	Verdünnung aus dem Überstand / Layer	Kolonien					
			CFU-E	BFU-E	CFU-GEMM	CFU-G	CFU-M	CFU-GM
primär human + 3,3 x 10^5	Überstand	1/5	0,5	7	0	58,5	27,5	1
		1/10	0	1,5	0	56,5	16,5	2,5
		1/50	0	0	0	7,5	3	0
	Layer	1/5	9,7	10	3	59	15	0,3
primär human + 6,6 x 10^5	Überstand	1/10	2	5,5	0	67	23,5	1
		1/20	1,5	2,5	1,5	37,5	10	1,5
		1/100	0	0	0	11,5	1,5	0
	Layer	1/5	17,3	13,3	5,7	89	9	1,3
M2 10B4 + 3,3 x 10^5	Überstand	1/5	0,5	0	0	8	3	3
		1/10	0	0	0	5,5	1,5	0
		1/50	0	0	0	1	0	0
	Layer	1/5	0	0	0	1,3	0	0
M2 10B4 + 6,6 x 10^5	Überstand	1/10	0	0	0	12	1	0
		1/20	0	0	0	11,5	2,5	0
		1/100	0	0	0	5,5	0	0
	Layer	1/5	0,3	0	0,3	6	0,3	0,3

Tabelle 4: Vergleich verschiedener Feeder – Layer (primär humaner Feeder-Layer, sowie Feeder-Layer aus der murinen Zellinie M2 10B4 und der humanen Zelllinie 88/5), und verschiedener Einfriermedien (Trehalose 0,5M, 1M und 2M jeweils mit und ohne Insulin, sowie DMSO 20%) in der Langzeitkultur mit kryokonserviertem Knochenmark.
Verglichen wird die Anzahl der Kolonien, die nach 2 Wochen Methylzellulose-Kultur abgelesen wurden. Die Kolonien werden unterschieden in CFU-E, BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G, CFU-M, CFU-GM.

Feeder-Layer + Einfrier-medium	Verdünnung	Kolonien					
		CFU-E	BFU-E	CFU-GEMM	CFU-G	CFU-M	CFU-GM
Primär humaner Feeder-Layer ohne Recharge	1/5	0	0	0	0	0	0
M2 10B4 ohne Recharge	1/5	0	0	0	0	0	0
88/5 ohne Recharge	1/5	0	0	0	0	0	0
Primär humaner Feeder-Layer + DMSO	1/10	0	17	4,5	70	13,5	7
	1/50	0,5	5	1	22,5	4,5	4
	1/500	0	0	0	8,5	0	1
Primär humaner Feeder-Layer + Trehalose 2M	1/10	0	13	1	73,5	10,5	5
	1/50	0,5	6,5	0,5	23,5	8,5	7,5
	1/100	0	1,5	0	15	5,5	4
Primär humaner Feeder-Layer + Trehalose 2M+Insulin	1/10	1	13	2,5	91	10,5	6
	1/50	1	2,5	0	16	10,5	4,5
	1/100	0	1,5	0	14	8,5	3,5
Primär humaner Feeder-Layer + Trehalose 1M	1/50	2	6,5	1,5	26	5,5	6,5
	1/100	0	1	1,5	18	4,5	5
Primär humaner Feeder-Layer + Trehalose 1M+Insulin	1/50	1	6	2	37	1	6
	1/100	0	4,5	0,5	18	6,5	3,5
Primär humaner Feeder-Layer + Trehalose 0.5M	1/10	0,5	27	0,5	91	17,5	1
	1/50	0,5	4,5	1,5	13,5	7,5	5,5
Primär humaner Feeder-Layer + Trehalose 0,5M+Insulin	1/10	0	16	1	87	12	0,5
	1/50	0	2	0,5	13,5	4,5	2
	1/100	0	2	0	9	3,5	0,5

Tabelle 4, Fortsetzung:

Feeder-Layer + Einfrier-medium	Verdünnung	Kolonien					
		CFU-E	BFU-E	CFU-GEMM	CFU-G	CFU-M	CFU-GM
M2 10B4 + DMSO	1/5	0	0	0	0	0	0
	1/50	0	0	0	0,5	0	0
M2 10B4 + Trehalose 2M	1/5	0	0	0	0,5	0	0,5
	1/50	0	0	0	0,5	0	0
M2 10B4 + Trehalose 2M+Insulin	1/5	0	0	0	0	0	0
	1/50	0	0,5	0	0	0	0
M2 10B4 + Trehalose 1M	1/5	0	0	0	0	0	0
	1/50	0	0	0	0	0	0
M2 10B4 + Trehalose 1M+Insulin	1/5	0	0	0	2	0	0
	1/50	0	0	0	0,5	0	0
M2 10B4 + Trehalose 0.5M	1/5	0	0	0	0	0	0
	1/50	0	0	0	0	0	0
M2 10B4 + Trehalose 0,5M + Insulin	1/5	0	0	0	2,5	0	0
	1/50	0	0	0	0	0	0
88/5 + DMSO	1/5	0	0	0	0	0	0
	1/50	0	0	0	0,3	0	0
	1/100	0	0	0	0	0	0
88/5 + Trehalose 2M	1/10	0	0	0	69	17	1,5
	1/50	0	1	0	16,5	11	1
	1/100	0	0	0	10,5	12,5	1
88/5 + Trehalose 2M+Insulin	1/50	0	1	0	13,5	14	2
	1/100	0	1	0	10,5	16	4
88/5 + Trehalose 1M	1/50	0,5	0,5	0	7,5	12	1,5
	1/100	0	0	0	5	9,5	4
88/5 + Trehalose 1M+Insulin	Contaminatio fungi						
88/5 + Trehalose 0.5M	1/10	0	0	0	71,5	28	2
	1/50	0	0,5	0	18,5	13	1
	1/100	0	0,5	0	9	8,5	1,5
88/5 + Trehalose 0,5M + Insulin	1/10	0	0	0	34	35	10
	1/50	0	2	0	12,5	11,5	4,5
	1/100	0	1	0	8	6,5	1,5

Tabelle 5:

Vergleich verschiedener Feeder – Layer (primär humaner Feeder, Feeder aus der humanen Zelllinie 88/5, Feeder aus der murinen Zelllinie M2 10B4) und verschiedener Einfriermedien (Trehalose 0,5 M, 1M, 2M, jeweils mit und ohne Insulinzusatz, DMSO 20%) in der Langzeitkultur mit kryokonserviertem Knochenmark.
Verglichen wird die Anzahl der Kolonien im MC-Assay, unterschieden nach Kolonien der roten und weißen Reihe.
Um die Koloniezahlen der verschiedenen Verdünnungen im Methylcellulose-Assay vergleichen zu können, wurden sie jeweils mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Dadurch kann die Koloniezahl ermittelt werden, die sich ergeben hätte, wenn 100% der zur Verfügung stehenden Zellen unter den jeweiligen Bedingungen in die Methylcellulose eingebracht worden wären (s. letzte Spalte: CFU´s hochgerechnet).

Kryomedium	Recharge-Zellzahl	Feeder-Layer	Verdünnung	CFU´s		CFU´s, hoch-gerechnet	
				rot	weiß	rot	weiß
DMSO	7,83 x 10^5	primär human	1/10	21,5	90,5	215	905
			1/50	6,5	31	325	1550
			1/500	0	9,5	0	4750
		88/5	1/5	0	0	0	0
			1/50	0	0,3	0	15
			1/100	0	0	0	0
		M2 10B4	1/5	0	0	0	0
			1/50	0	0,5	0	25
Trehalose 2M	7,33 x 10^5	primär human	1/10	14	89	140	890
			1/50	7,5	39,5	375	1975
			1/100	1,5	24,5	150	2450
		88/5	1/10	0	87,5	0	875
			1/50	1	28,5	50	1425
			1/100	0	24	0	2400
		M2 10B4	1/5	0	1	0	5
			1/50	0	0,5	0	25
Trehalose 2M + Insulin	2,17 x 10^5	primär human	1/10	16,5	107,5	165	1075
			1/50	3,5	31	175	1550
			1/100	1,5	26	150	2600
		88/5	1/50	1	29,5	50	1475
			1/100	1	30,5	100	3050
		M2 10B4	1/5	0	0	0	0
			1/50	0,5	0	25	0

Tabelle 5, Fortsetzung:

Kryomedium	Recharge-Zellzahl	Feeder-Layer	Verdünnung	CFU´s		CFU´s hoch-gerechnet	
				rot	weiß	rot	weiß
Trehalose 1M	3,83 x 10^5	primär human	1/50	10	38	500	1900
			1/100	2,5	27,5	250	2750
		88/5	1/50	1	21	50	1050
			1/100	0	18,5	0	1850
		M2 10B4	1/5	0	0	0	0
			1/50	0	0	0	0
Trehalose 1M + Insulin	2 x 10^5	primär human	1/50	9	44	450	2200
			1/100	5	28	500	2800
		88/5	Contaminatio fungi				
		M2 10B4	1/5	0	2	0	10
			1/50	0	0,5	0	25
Trehalose 0,5M	7,33 x 10^5	primär human	1/10	28	109,5	280	1095
			1/50	6,5	26,5	325	1325
		88/5	1/10	0	101,5	0	1015
			1/50	0,5	32,5	25	1625
			1/100	0,5	19	50	1900
		M2 10B4	1/5	0	0	0	0
			1/50	0	0	0	0
Trehalose 0,5M +Insulin	1,5 x 10^5	Feeder human	1/10	17	99,5	170	995
			1/50	2,5	20	125	1000
			1/100	2	13	200	1300
		88/5	1/10	0	79	0	790
			1/50	2	28,5	100	1425
			1/100	1	16	100	1600
		M2 10B4	1/5	0	2,5	0	12,5
			1/50	0	0	0	0

Abbildung 1: Vergleich der Feeder-Layer (primär humaner und M2 10B4) bezüglich der Koloniezahlen im MC-Assay:

Die Kolonien werden in dieser Darstellung nicht nach ihrer Differenzierungsrichtung unterschieden. Es werden einerseits die Gesamtkoloniezahlen verglichen, andererseits werden die Kolonien aus der adhärenten und nicht-adhärenten Fraktion getrennt dargestellt. Verwendet wurden Ergebnisse der 1/10-Verdünnung bei Kulturen der nicht-adhärenten Fraktion und Ergebnisse der 1/5-Verdünnungen bei Kulturen der adhärenten Fraktion. Die Einzelergebnisse, differenziert in Ergebnisse aus der adhärenten (Layer) und der nicht adhärenten Fraktion (Überstand), sind aus Tabelle 1 Spalte 7 (CFU´s gesamt pro 1,1 ml MC-Zellsuspension) ersichtlich.

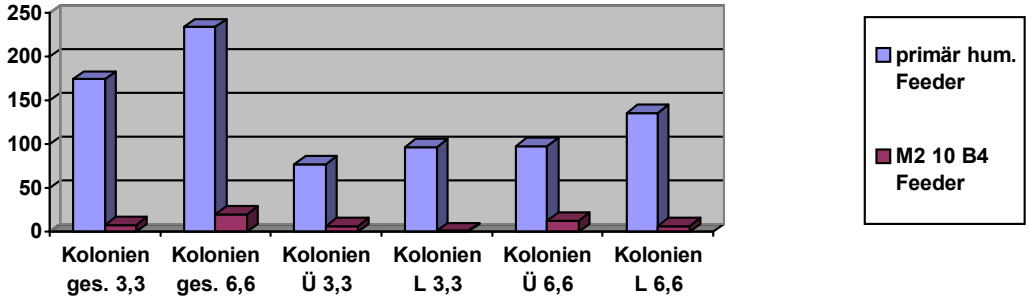


Abbildung 2: Vergleich verschiedener Feeder-Layer und Einfriermedien bezüglich des Outcomes an Kolonien der roten Zellreihe:

Es wurden Ergebnisse der Verdünnung 1/50 verwendet. Die gezählten Kolonien wurden mit 50 multipliziert, also auf 100% Zelleinsaat in die Methylcellulose hochgerechnet. Die Ordinaten-Achse zeigt die auf 100% hochgerechnete Koloniezahl.
Die Ergebnisse in Zahlen sind in Tabelle 5 dargestellt.

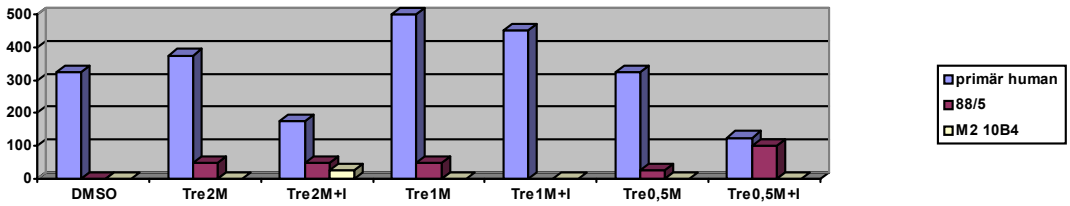
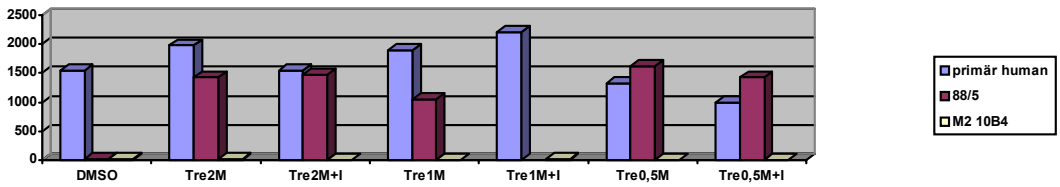


Abbildung 3: Vergleich verschiedener Feeder-Layer und Einfriermedien bezüglich der Generierung von weissen Kolonien:

Es wurden Ergebnisse der Verdünnung 1/50 verwendet. Die Kolonien wurden auf 100% Zelleinsaat hochgerechnet. Die Ordinaten-Achse zeigt die auf 100% hochgerechnete Koloniezahl.
Die Ergebnisse in Zahlen sind in Tabelle 5 dargestellt.



4.3.2 Vergleich DMSO – Trehalose in der LTC

Auf Grund der in 4.3.1 beschriebenen Ergebnisse wurde der Vergleich von DMSO und Trehalose gefrorenem Knochenmark mit primär humanem Feeder-Layer und 1M Trehalose ohne Insulinzusatz durchgeführt.
In 3 unabhängigen Versuchen wurde folgendes Ergebnis festgestellt:
Mit Trehalose 1M gefrorenes Knochenmark scheint bezüglich der Koloniezahlen im an die LTC anschliessenden MC-Assay dem mit DMSO gefrorenen Knochenmark vergleichbar.
Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, weder unter Berücksichtigung der Gesamtkoloniezahl, noch der in Untergruppen differenzierten Kolonien.
Die Versuchsergebnisse mit Mittelwert und Standardabweichung, sowie die Ergebnisse der Signifikanzprüfung sind in Tabelle 6 zusammengestellt. In Abbildung 4 sind die Versuchsergebnisse mit Mittelwert und Standardabweichung verdeutlicht.

Tabelle 6:
Vergleich von Trehalose und DMSO an Hand der Ergebnisse aus den LTC-Versuchen mittels folgender Werte: Mittelwert der Koloniezahlen ± Standardabweichung, sowie Signifikanzprüfung mittels student´s t-test.
Es werden die Koloniezahlen im MC-Assay / ml verarbeitetes KM angegeben.

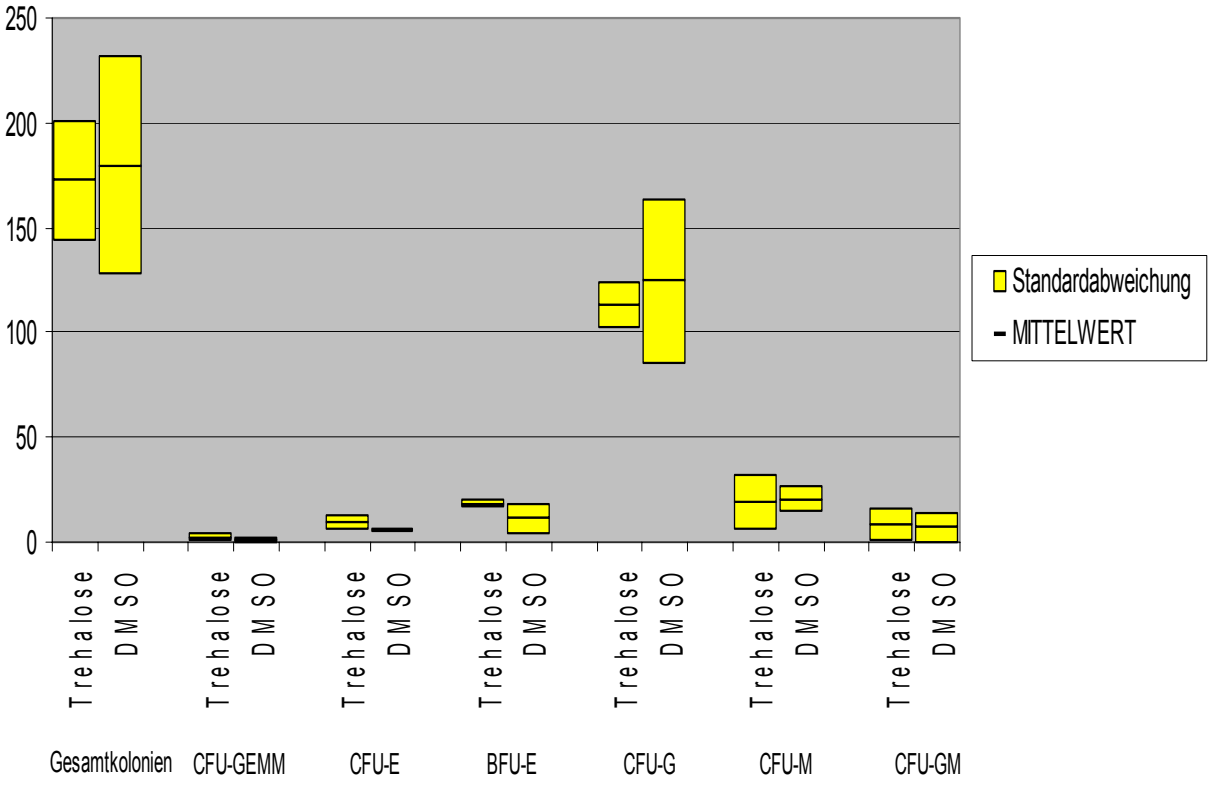
	Trehalose	DMSO	Student‘s t-test (p=0,05)
	Mittelwert ± Standardabweichung	Mittelwert ± Standardabweichung	
Gesamtkolonien	172,66 ± 28,378	170 ± 52,048	(142,178,198; 113,182,215) p = 0,94
CFU-GEMM	2,66 ± 1,1547	1 ± 1	(2,2,4; 1,0,2) p = 0,133
CFU-E	9,33 ± 3,055	5,6 ± 0,577	(10,12,6; 6,5,6) p = 0,169
BFU-E	18,6 ± 1,5275	11,33 ± 6,807	(19,17,20;6,9,19) p = 0,198573
CFU-G	113,33 ± 10,693	124,66 ± 38,683	(101,120,119;80,147,147) p= 0,6674
CFU-M	19,33 ± 12,897	20,66 ± 5,686	(5,23,30;16,19,27) p = 0,881
CFU-GM	8,33 ± 7,572	7 ± 7	(3,5,17;4,2,15) p = 0,83

Abbildung 4:

Vergleicht von DMSO und Trehalose an Hand der Ergebnisse aus den LTC-Versuchen.

Es werden für die Gesamtkoloniezahlen, wie für die Zahl der nach ihrer Differenzierungsrichtung unterschiedenen Kolonien jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung dargestellt.

Die Mittelwerte sind als waagrechte Linie symbolisiert, die Standardabweichung als Balken über und unter dem Mittelwert.



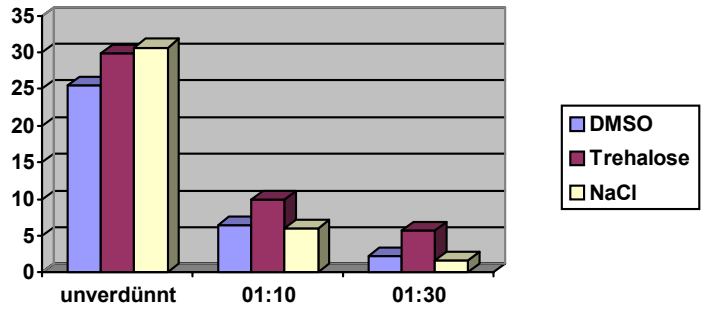
4.3.3 Radioimmunassay zur Bestimmung der C3a Konzentration in mit DMSO bzw. mit Trehalose gefrorenen Knochenmarksproben

4.3.3.1 Ermittlung einer geeigneten Verdünnung

Die C3a-Konzentrationen der mit DMSO, Trehalose, bzw. mit NaCl gefrorenen, frisch aufgetauten Knochenmarkproben, die 1:10 mit PBS verdünnt wurden, liegen mit großem Sicherheitsabstand im für den Radioimmunoassay-Kit der Firma Biotrak validen Konzentrationsbereich von 1-25 ng/50µl. Die Einzelergebnisse sind aus Abbildung 5 ersichtlich.

Abbildung 5: Vergleich verschieden hoch verdünnter kryokonservierter Knochenmark-Proben bezüglich ihrer C3a-Konzentration

Es werden unverdünnte kryokonservierte, frisch aufgetaute KM-Proben mit 1:10 und 1:30 mit PBS verdünnten kryokonservierten, frisch aufgetauten KM-Proben verglichen.



Ordinate: C3a-Konzentration in den Proben in ng/50µl

4.3.3.2 Vergleich DMSO – Trehalose

Zwischen mit DMSO und Trehalose gefrorenem Knochenmark ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der C3a-Konzentration (student‘s t-test: p = 0,3048).

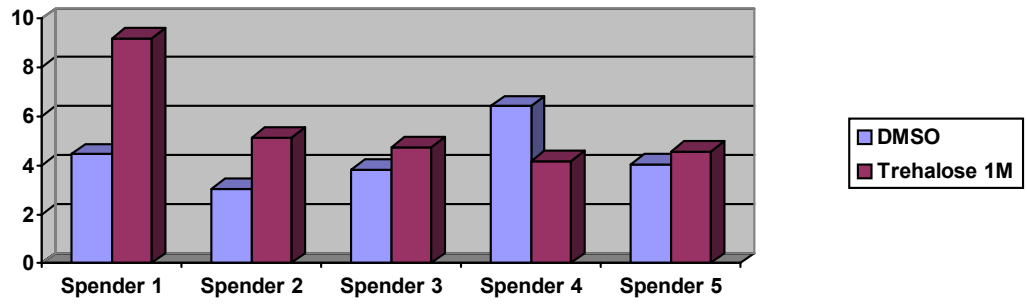
n = 5;

Mittelwert ± Standardabweichung (DMSO): 4,3541ng/50µl ± 1,2689 ng/50µl;

Mittelwert ± Standardabweichung (Trehalose): 5,5585 ng/50µl ± 2,0635 ng/50µl

Die Einzelergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 6: Vergleich der Einzelergebnisse der C3a-Konzentration verschiedener Knochenmark-Proben



Ordinate: C3a-Konzentration der KM-Proben in ng/50µl

5. Diskussion

Die Transplantation humaner hämatopoetischer Stammzellen hat sich in den letzten Jahren zu einem häufig angewandten Verfahren entwickelt und ermöglicht den Einsatz aggressiverer und effektiverer Chemo- und Strahlentherapien. Häufig ist es hierbei notwendig, diese Stammzellen für einen unterschiedlich langen Zeitraum bis zur Transplantation in flüssigem Stickstoff aufzubewahren. In diesen Fällen wird das Knochenmark routinemäßig 1:1 mit 20%iger DMSO-Lösung (Dimethylsulfoxid) unter kontrollierten Einfrierbedingungen kryokonserviert.

Das frisch aufgetaute DMSO haltige Knochenmarkblut wird dem Patienten bei etwa 4°C infundiert, um eine bei höheren Temperaturen verstärkt stattfindende Zellschädigung durch DMSO zu vermeiden. Diese erprobte und als relativ sicher geltende Transplantationsmethode birgt für den Patienten jedoch das Risiko belastender und selten auch lebensbedrohlicher Reaktionen (Kappicht 2000, Okamoto1993, Rapoport 1991, Styler 1992, Smith1987, Davis1990, Stroncek 1991, Kessinger 1990), zum Teil bedingt durch die notwendig - niedrige Temperatur des Transplantats, zum Teil bedingt durch den Gehalt an DMSO selbst (Kappicht 2000, Rowley 1993, Bond 1989, Yellowless 1980, Brobyn 1975). Aus diesem Grund wurden verschiedene Versuche unternommen, um den Einsatz von DMSO möglichst weit zu reduzieren und mögliche Alternativen wie beipielsweise Glycerol, PVP oder HES zu untersuchen (Sputtek 1997, Gorin 1992, Sherman 1976). Trotz zum Teil ermutigender Ergebnisse zeigte letztlich keine dieser Substanzen ein dem DMSO ebenbürtiges kryoprotektives Potential. Sputtek (1997) beispielsweise fand in seinen Versuchen mit DMSO und HES, dass eine mindestens 5%ige DMSO-Endkonzentration im Kryopräparat notwendig ist, um im Methylcellulose-Assay colony-forming-units nachzuweisen. Daher besteht weiterhin die Notwendigkeit, nach einer gleichwertigen, aber verträglicheren Alternativsubstanz zu suchen, um DMSO weitestgehend vermeiden zu können und somit das Verfahren der Stammzelltransplantation für den Patienten zu optimieren.

5.1 Kryoprotektive Eigenschaften von Trehalose

Es ist bekannt, dass einige Organismen, wie beispielsweise die Bäckerhefe, einige Nematoden und Bakterien, die Tiefkühlung und darauf folgende Wiedererwärmung überleben, in Stresssituationen das Disaccherid Trehalose produzieren können (Crowe 1992, Leslie 1994, Sano 1999, Diniz-Mendes 1999, Cerrutti 2000). Darauf aufbauend wurde Trehalose an Modellbilayeren, Bakterien, Pilzen, bis hin zu komplexen Geweben, wie z.B. an humanem Pankreasgewebe auf seine kryoprotektiven Eigenschaften hin untersucht (Crowe 1992, Yokomise 1995, Leslie 1995, Pugh 2000, Reid 1999, Valdez 1992, Anchordoguy 1987). Einige Autoren berichten, dass sie in verschiedenen Fällen durch Zugabe von Trehalose zu DMSO eine Verbesserung des kryoprotektiven Potentials des Mediums erzielten konnten (Zhang 2003, Beattie 1997, Limaye 2001, Kim 2001). Beattie (1997) konnte nachweisen, daß die Überlebensraten von kryokonservierten humanen Pankreasinselzellen durch die Zugabe von Trehalose zur DMSO-Lösung um mehr als 1/3 stiegen. Kim (2001) beobachtete, daß die Verwendung von Trehalose, verglichen mit einer DMSO-Glycerol-Mischung als Kryoprotektivum für Taxus

chinensis Zellen die Teilungsfähigkeit der geforenen und wiederaufgetauten Zellen verbesserte. Die Funktionsfähigkeit der Zellen, gemessen an ihrer Fähigkeit Paclitaxel zu produzieren, war nach dem Tiefkühlen und Wiederauftauen nicht beeinträchtigt. Andere Untersucher konnten in vitro und am Tiermodell zeigen, dass Trehalose auch ohne die Anwesenheit von DMSO hervorragende kryoprotektive Eigenschaften hat (Yokomise 1995, Crowe 1992, Leslie 1995, Sztein 2001). So fand beispielsweise Sztein (2001) bei mit Trehalose kryokonservierten Mausspermien bessere Motilitätsraten als bei mit DMSO kryokonservierten Mausspermien.
Limaye und Kale zeigten, dass der Zusatz von Trehalose zur routinemäßig verwendeten 10%igen DMSO-Lösung die Kryoprotektion für humane hämatopoetische Zellen aus Nabelschnurblut und fetalem Lebergewebe deutlich verbessert (Limaye 2001). Als Maßstab für die Qualität der Kryoprotektion untersuchten Limaye und Kale das klonogene Potential der Zellen mit Hilfe eines zwei-wöchigen Methylzellulose-Assays. Kappicht fand in ihren Versuchen mit humanen Knochenmarkzellen und PBSC Hinweise, dass auch Trehalose allein als Kryoprotektivum dem üblicherweise verwendeten DMSO zumindest gleichwertig ist (Kappicht 2000). Auch sie verwendete zwei-wöchige Methylzellulose-Assays, um die Klonogenität der hämatopoetischen Zellen zu prüfen. Die Art und Zahl der CFU´s (Colony forming units) in der Kurzzeit-Kultur gibt einen Hinweis auf die Zahl der in der Kultur vorhandenen vitalen hämatopoetischen Stammzellen. Jedoch kann mit Hilfe des Kurzzeit-Assays nur ungenau zwischen Stammzellen mit Selbsterneuerungspotential und bereits weiter ausdifferenzierten klonogenen Zellen unterschieden werden. Besser geeignet ist hierzu die Langzeitkultur (LTC), eine Methode, die untersucht, ob nach 5 Wochen in Kultur immer noch Zellen vorhanden sind, die im anschließenden zwei-wöchigen Methylzellulose-Assay Kolonien bilden. Diese Zellen nennt man beschreibend Long-term-culture-initiating-cells (LTCIC) und setzt sie der hämatopoetischen Stammzelle gleich (Eaves 1992, Winton 1987). Für ein erfolgreiches Engraftment eines Transplantats mit hämatopoetischen Zellen ist eine ausreichende Zahl an LTCIC im Transplantat erforderlich (Dounay 1982).
Zhang et al (2003) untersuchten kryokonservierte hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut auf das Überleben von LTCIC sowie auf ihre Fähigkeit in nonobese diabetic SCID Mäusen ein alle Zelllinien umfassendes Engraftment zu bewirken. In diesen Studien zeigte eine Kombination von DMSO und 5%iger Trehalose bessere Ergebnisse als DMSO alleine. Für Trehalose alleine konnte in diesen Studien allerdings kein bedeutendes kryoprotektives Potential nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ergaben unsere Untersuchungen, in denen wir ebenfalls in kleinvolumigen Einfriergefässen kryokonservierte HSC auf LTCIC hin untersuchten, für DMSO wie für Trehalose alleine vergleichbare Ergebnisse. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch zwei Unterschiede in der Versuchsplanung bedingt sein: Wir entwickelten zunächst eine LTC-Methode für DMSO- und Trehalose-gefrorenes Knochenmark, indem wir etablierte LTC-Methoden für frisches Knochenmark modifizierten (siehe 5.2). Im Rahmen dessen entschieden wir uns für einen Layer aus frischem humanem Knochenmark, während Zhang et al für ihre Untersuchungen den Feeder-Layer der M210B4-Zelllinie verwendeten, der in unseren Untersuchungen die mit Abstand niedrigsten Koloniezahlen hervorbrachte. Wir verglichen ausserdem verschiedene Trehalosekonzentrationen und untersuchten, ob ein Zusatz von Insulin zur Trehaloselösung die Kryoprotektion verbessert. Hier fanden wir, dass 1M und 2M Trehalose etwas bessere Ergebnisse zeigten als 0,5M Trehalose. Wir entschieden uns im Hinblick auf einen potentiellen späteren klinischen Einsatz für die weiteren Versuche für 1M Trehalose, was einer 18%igen Trehalose-Endkonzentration entspricht und damit für eine höhere Trehalosekonzentration als Zhang et al. Der Insulinzusatz zeigte in unseren

Versuchen keine deutlichen Vorteile, so dass wir uns im Hinblick auf einen späteren klinischen Einsatz bei den weiteren Versuchen gegen die Verwendung von Insulin entschieden.
Um vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können verwendeten wir für DMSO und für Trehalose ein Einfrierprotokoll, dass bekanntermaßen für DMSO optimale Ergebnisse erzielt. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass mit einem für Trehalose optimierten Einfrierprotokoll die Ergebnisse in der LTC für Trehalose möglicherweise noch verbessert werden könnten.

5.2 Langzeitkultur von kryokonservierten Knochenmarkzellen

Für Langzeitkulturen mit Trehalose kryokonserviertem Knochenmark lagen bisher keine Erfahrungen vor. Wir orientierten uns an den Erfahrungen von Eaves et al mit frischem Knochenmark, und verglichen außerdem drei verschiedene Feederlayer an Hand ihrer Fähigkeit, die Langzeitkultur zu unterstützen, sowie verschiedene Zelleinsaaten. Wir verglichen die murine Stromazelllinie M2 10B4, die humane Stromazellinie 88/5 und primären humanen Feederlayer aus frischem Knochenmark. Sutherland (1991) und Hogge (1996) fanden in ihren Untersuchungen mit frischen humanen CD34+ Zellen, dass M2 10B4-Feeder die Langzeitkultur ebensogut unterstützt wie primär humaner Feeder. Wir konnten diese Ergebnisse für mit DMSO bzw. mit Trehalose kryokonserviertes Knochenmark nicht bestätigen. In unseren Untersuchungen zeigte sich der primär humane Feeder der M2 10B4-Linie deutlich überlegen.
Thalmeier et al (1994, 1996) untersuchten die humane Zellinie 88/5 auf Zytokin-Expression und Zytokin-Rezeptor-mRNA und fanden, verglichen mit primär humanem Stroma, ein fast identisches Muster. In ihren Untersuchungen 1994 zeigten sie, dass die Zelllinie 88/5 fähig ist, Langzeitkulturen mit CD34+ Zellen aus menschlichem Nabelschnurblut zu unterstützen. Wir konnten das in unseren Experimenten mit humanem Knochenmark bestätigen, fanden den primär humanen Feeder-Layer der humanen Zellline 88/5 jedoch deutlich überlegen. Der Unterschied war besonders ausgeprägt in den Versuchen mit DMSO-gefrorenem Knochenmark.
Bezüglich verschiedener Recharge-Zellzahlen zeigten sich in unseren Langzeitkulturen mit DMSO- und Trehalose-kryokonserviertem Knochenmark keine wesentlichen Unterschiede. So entschieden wir uns für die von Eaves et al (1991) für frisches Knochenmark empfohlene Zelleinsaat von $5x10^5$ Zellen pro 35mm Petrischale und für einen primären Feeder-Layer aus frischem humanem Knochenmark.

5.3 Komplementaktivierung in mit Trehalose oder DMSO inkubiertem oder gefrorenem Knochenmark

Kappicht (2000) fand, dass die Häufigkeit und Schwere der unerwünschten Wirkungen bei Knochenmarktransplantationen mit DMSO-kryokonserviertem Knochenmark positiv mit der Höhe der Komplementaktivierung in vivo korreliert. Darauf aufbauend verglichen wir mit Hilfe eines Radioimmunoassays für C3a-desArg das Ausmaß der Komplementaktivierung in vitro in mit DMSO und mit Trehalose gefrorenem

Knochenmark. In den hier beschriebenen Versuchen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der C3a-Konzentration in mit DMSO- oder mit Trehalose – kryokonserviertem Knochenmark feststellen. Allerdings ist der C3adesArg-RIA ist ein relativ störanfälliger Test, insbesondere bei der Arbeit mit verdünnten Proben. Darüberhinaus könnte die hohe Viskosität der Trehalose-Lösung zu einer Beeinträchtigung der Sedimentationsfähigkeit der radioaktiv markierten Antigen-Antikörperkomplexe und somit zu falsch hohen Ergebnissen führen. Die deutliche Streubreite der Ergebnisse, insbesondere bei mit Trehalose gefrorenem Knochenmark, kann als Indiz gewertet werden, dass der Assay in den hier beschriebenen Versuchen keine wirklich zu reproduzierenden Ergebnisse liefert. Eine mögliche Komplementaktivierung durch Trehalose lässt sich auf Grund dieser Versuchsreihe daher nicht abschließend beurteilen.

5.4 Offene Fragen

Obwohl die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Trehalose die für ein erfolgreiches Engraftment bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation notwendigen frühen Vorläuferzellen der Hämatopoese ebensogut vor Gefrier- und Auftauschäden schützt wie die Standardlösung DMSO, bleiben vor einem möglichen Einsatz am Menschen jedoch noch einige Fragen zu klären. Trehalose ist ein für Menschen unphysiologisches Disaccharid. Es ist unklar, ob es verstoffwechselt werden kann, ausgeschieden oder gespeichert würde. Aus diesem Grund sollte die Metabolisierung von Trehalose im Organismus nach intravenöser Applikation untersucht werden. In bisher beschriebenen in vivo Experimenten mit Mäusen wurden keine offensichtlich Trehalose-bezogenen unerwünschten Reaktionen beobachtet (Zhang 2003). Untersuchungen mit Maus-Oozyten und Embryonen mit 1M Trehalose-Konzentration zeigten ebenfalls keine Hinweise auf eine durch Trehalose bedingte Toxizität (Kuleshova 1999). Dennoch sollte in weiteren in vivo Versuchen an Tiermodellen die Verträglichkeit von Trehalose, einschließlich einer möglichen in vivo Komplementaktivierung, überprüft werden. Eine mögliche in vitro Komplementaktivierung in mit Trehalose gefrorenem Knochenmark muss in größeren Versuchsreihen und eventuell mit anderen Methoden untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Knochenmark oder periphere Blutstammzellen (PBSC) werden unter anderem für autologe oder, z.B. aus logistischen Gründen, für allogene hämatopoetische Stammzelltransplantationen kryokonserviert. Üblicherweise wird hierfür das Knochenmark 1:1 mit einer 20%igen DMSO – Lösung gemischt und kontrolliert eingefroren. Das frisch aufgetaute Knochenmark–DMSO Gemisch wird dem Patienten bei etwa 4°C infundiert, um eine bei höheren Temperaturen verstärkt stattfindende Zellschädigung durch DMSO zu vermeiden. Diese Transplantationsmethode mit DMSO-kryokonservierten Zellen birgt für den Patienten ein nicht unerhebliches Risiko belastender und selten auch lebensbedrohlicher Reaktionen. Diese können einerseits durch die niedrige Reinfusionstemperatur des Transplantats, andererseits aber auch durch den Gehalt an DMSO im Transplantat hervorgerufen werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Disaccharid Trehalose im Hinblick auf seine Eignung als mögliche Alternativsubstanz zu DMSO geprüft.

Um das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen untersuchen zu können, mußten zunächst die optimalen Bedingungen für die Langzeitkultur von frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen aus mit DMSO- oder Trehalose-kryokonserviertem Knochenmark untersucht werden. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass sich als Überlebensmatrix in der Langzeitkultur (Feeder-Layer) am besten frisch entnommene und bestrahlte Zellen aus Knochenmarkblut eigneten.

Unter Verwendung dieses Feeder-Layers konnte nachgewiesen werden, dass nach einer 5-wöchigen Kultur sowohl DMSO- als auch Trehalose-kryokonservierte Zellen in der Lage waren, im Methylzellulose-Assay Kolonien zu generieren. Sowohl im Hinblick auf die Anzahl, als auch auf den Grad der Differenzierung der im Methylcellulose-Assay gezüchteten Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen, die primär mit DMSO oder mit Trehalose als Frostschutzsubstanz eingefroren wurden.

Nachdem bekannt ist, daß DMSO in vitro eine Komplementaktivierung verursacht und es darüberhinaus Hinweise gibt, daß die Höhe der Komplementaktivierung mit der Häufigkeit und Schwere der bei der Transplantation auftretenden Nebenwirkungen korreliert, untersuchten wir zusätzlich im Radioimmunoassay die Höhe der C3a – Konzentration in mit DMSO- oder Trehalose-tiefgefrorenem Knochenmarkblut. Dieser Assay lieferte jedoch, insbesondere bei mit Trehalose-kryokonservierten Zellen nur schwer reproduzierbare (große Standardabweichung) Ergebnisse, die möglicherweise durch die hohe Viskosität der Trehaloselösung bedingt waren. Deshalb kann mit den hier vorgelegten Ergebnissen keine sichere Aussage bezüglich des Komplement-aktivierenden Potentials von Trehalose getroffen werden.

Trotzdem belegen die hier beschriebenen Versuche, daß Trehalose eine vielversprechende Substanz für den Schutz von hämatopoetischen Stammzellen bei der Kryokonservierung ist. Vor dem klinischen Einsatz beim Menschen, sollten jedoch noch Versuche im Tiermodell erfolgen, um die Sicherheit und Effektivität dieses Verfahrens auf eine noch solidere Basis zu stellen.

.

7. Literaturverzeichnis

Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology 24 (4):324-31. Abstract

de-Araujo PS. 1996. The role of trehalose in cell stress. Braz J Med Biol Res 29(7):873-5. Abstract

Barnes DW, Loutit JF. 2001. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow: II 1957. J Hematother Stem Cell Res 10(3): 325-34

Beattie GM, Crowe JH, Lopez AD, Cirulli V, Ricordi C, Hayek A. 1997. Trehalose: a cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage. Diabetes 46(3):519-23

Beattie GM, Leibowitz G, Lopez AD, Levine F, Hayek A. 2000. Protection from cell death in cultured human fetal pancreatic cells. Cell Transplant 9(3):431-8. Abstract

Bedi A, Sharkis SJ. 1995. Mechanisms of cell commitment in myeloid cell differentiation. Current opinion in Hematology 2:12-21

Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. 1995. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. Science Vol.267

Bertolini F, Battaglia M, Corsini C, Lazzari L, Soligo D, Zibera C, Thalmeier K. 1996. Engineered stromal layers and continuous flow culture enhance multidrug resistance gene transfer in hematopoietic progenitors. Cancer research 56:2566-2572

Böck M, Glaser A, Pfosser A, Schleuning M, Heim MU, Mempel W. 1993. Storage of single-donor platelet concentrates: metabolic and functional changes. Transfusion 33:311-315

Böck M, Heim MU, Schleuning M, Kempter B, Mempel W. 1994. Previous activation of platelets during storage: possible causes. Beitr Infusionsther Transfusionsmed 32:81-3

Böck M, Schleuning M, Heim MU, Mempel W. 1995. Cryopreservation of human platelets with dimethyl sulfoxide: changes in biochemisrty and cell function. Transfusion 35: 921-924

Bond GR, Curry SC, Dahl DW. 1989. Dimethylsulphoxide-induced encephalopathy (letter). Lancet 1:1134-5

Breems DA, Blokland EAW, Neben S, Ploemacher RE. 1994. Frequency analysis of human primitive haematopoietic stem cell subsets using a cobblestone area forming cell assay. Leukemia 8(7):1095-1104

Brobyn RB. 1975. The human toxicology of dimethyl sulfoxide. Ann NY Acad Sci:243:497-506.

Bucher O, Wartenberg H. 1992. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 11. Auflage. Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto

Cerrutti P, Segovia de Huergo M, Galvagno M, Schebor C, del Pilar Buera M. 2000. Commercial baker´s yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. Appl Microbiol Biotechnol 54(4):575-80. Abstract

Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ. 1983. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. Blood 62(2):291-297

Coutinho LH. Cp. 11 Long-term bone marrow culture. aus Cultures using human bone marrow, A practical approach.

Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. 1992. Anhydrobiosis. Annu Rev Physiol 54: 579-99

Davis JM, Rowley SD, Braine HG, Piantadosi S, Santos GW. 1990. Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. Blood:75:781-6

Dexter TM, Spooncer E, Toksoz D, Lajtha LG. 1980. The role of cells and their products in the regulation of in vitro stem cell proliferation and granulocyte developement. Journal of supramolecular structure 13:513-524

Diniz-Mendes L, Bernardes E, de Araujo PS, Panek AD, Paschoalin VM. 1999. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. Biotechnol Bioeng 65(5):572-8. Abstract

Dooley DC, Law Ping. 1992. Detection and quantitation of long-term culture-initiating cells in normal human peripheral blood. Experimental Hematology 20:156-160

Dounay L, Gorin NC, David R, Stachowiak J, Salmon CH, Najman A, Duhamel G. 1982. Study of granulocyte-macrophage progenitor (CFUc) preservation after slow freezing of bone marrow in the gas phase of liquid nitrogen. Experimental hematology 10(4):360-366

Eaves CJ, Cashman JD, Eaves AC. 1991. Methodology of long-term culture of human hemopoietic cells. Journal of tissue culture methods 13:55-62

English D, Klingemann HG. 2001. The foundations of cellular therapy: Barnes and Loutit, 1957. J Hematother Stem Cell Res 10(3): 323-4

Gorin NC. 1992. Capter 9: Cryopreservation and storage of stem cells. Page 292-308 aus:
Bone marrow and stem cell processing: A manual of current techniques. edited by Areman EM, Deeg HJ, Sacher RA. Philadelphia: Davis FA. ISBN 0803602669

Harrison. Harrison´s principles of internal medicine, 14th edition; copyright 1997 by the McGraw-Hill-Companies Inc

Hogge DE, Landsdorp PM, Reid D, Gerhard B, Eaves CJ. 1996. Enhanced detection, maintenance, and differentiation of primitive human hematopoietic cells in cultures containing murine fibroblasts engineered to produce human steel factor, interleukin-3, and granulocyte colony-stimulating factor. Blood 88(10):3765-3773

Kappicht S, Kolb HJ, Schleuning M. 1999. Trehalose- an alternative to DMSO in cryopreservation of hematopoietic cells. Bone Marrow Transplatat 23(Suppl 1):202, Abstract no. 675

Kappicht S. 2000. Komplementaktivierung und Nebenwirkungen bei Transplantationen mit DMSO-kryokonservierten haematopoetischen Stammzellen und Untersuchungen zur Eignung von Trehalose als Kryoprotektivum. Dissertation zum Erwerb des Doktorgades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München

Kessinger A, Schmidt-Pokorny K, Smith D, Armitage J. 1990. Cryopreservation and infusion of autologous peripheral blood stem cells. Bone Marrow Transplant 5(Suppl 1): 25-7.

Kim SI, Choi HK, Son JS, Yun JH, Jang MS, Kim HR, Song JY, Kim JH, Choi HJ, Hong SS. 2001 Cryopreservation of Taxus chinensis suspension cell cultures. Cryo Letters 22(1):43-50 (Abstract)

Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. Cryobiology 38(2):119-30 (Abstract)

Laver AJ, Hibbs M, Smith RAG. 1995. Activation of complement by DMSO and ethanol and its inhibition by soluble complement receptor type 1. Biochemical Society Transactions 23:167

Leslie SB, Teter SA, Crowe LM, Crowe JH. 1994. Trehalose lowers membrane phase transition in dry yeast cells. Biochimica et Biophysica Acta 1192: 7-13

Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl Environ Microbiol 61(10):3592-7

Limaye LS, Kale VP. 2001. Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium. J Hematother Stem Cell Res 10(5):709-18

Okamoto Y, Takaue Y, Saito S, Shimizu T, Abe T, Sato J, Hirao A, Watanabe T, Kawano Y, Kuroda Y. 1993. Toxicities associated with cryopreserved and thawed peripheral blood stem cell autografts in children with active cancer. Transfusion 33(7):578-581

Pettengell R, Luft T, Henschler R, Hows J, Dexter M, Ryder D, Testa N. 1994. Direct comparison by limiting dilution analyses of long-term-culture-initiating cells in human bone marrow, umbilical cord blood, and blood stem cells. Blood 84(11):3653-3659

Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. Anim Reprod Sci; 28;58(1-2):9-22. Abstract

Rapoport AP, Rowe JM, Packman CH, Ginsberg SJ. 1991. Cardiac arrest after autologous marrow infusion. Bone Marrow Transplant 7:401-3

Reid TJ, Esteban G, Clear M, Gorogias M. 1999. Platelet membrane integrity during storage and activation. Transfusion 39(6):616-24. Abstract

Richard SM, William MB. 1980. Effect of dimethylsulphixide on renal function in man. JAMA 244:2081-3.

Rowley SD, Anderson GL. 1993. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. Bone Marrow Transplant 11:389-393

Salat C, Holler E, Schleuning M, Eisele B, Reinhardt B, Kolb H, Pihusch R, Domrath R, Hiller E. 1995. Levels of the terminal complement complex, C3a-desArg and C1-inhibitor in adult patients with capillary leak syndrome following bone marrow transplantation. Ann Hematol 71:271-274

Sano F, Asakawa N, Inoue Y, Sakurai M. 1999. A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. Cryobiology 39: 80-87

Schleuning M, Böck M, Mempel W. 1994. Complement activation during storage of single-donor platelet concentrates. Vox Sang 67(2):144-8

Schleuning M, Utz H, Heim M, Mempel W. 1992. Effects of leukocyte depletion on the formation of anaphylatoxins in stored whole blood. Infusionsther Transfusionsmed 19(5):242-4

Schleuning M, Schmid-Haslbeck M, Utz H, Jochum M, Heim M, Mempel W, Wilmanns W. 1992. Complement activation during storage of blood under normal blood bank conditions. Effects of proteinase inhibitors and leukocyte depletion. Blood 79(11):3071-5

Schleuning M, Utz H, Heim M, Mempel W. 1992. Decreased formation of the complement component C4A in leukocyte-depleted stored whole blood. Beitr Infusionsther 30:182-5

Schleuning M, Stoetzer O, Waterhouse C, Schlemmer M, Ledderose G, Kolb HJ. 2002. Hematopoietic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning as treatment of sickle cell disease. Experimental Hematology 30:7-10

Sherman JK, Liu KC. 1973. Ultrastucural cryoinjury and cryoprotection of rough endoplasmatic reticulum. Cryobiology 10:104-118

Sherman JK, Liu KC. 1976. Relation of ice formation to ultrastructural cryoinjury and cryoprotection or rough endoplasmatic reticulum. Cryobiology 13:599-608

Smith DM, Weisenburger DD, Bierman P, Kessinger A, Vaughan WP, Armitage J. 1987. Acute renal failure associated with autologous bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 2:195-201.

Sputtek A, Jetter S, Hummel K, Kuhnl P (1997) Cryopreservation of peripheral blood progenitor cell: characteristics of suitable techniques. Beitr Infusionsther Transfusionsmed 34:76-83

Stroncek DF, Fautsch SK, Lansky LC, Hurd DD, Ramsay NKC, McCullough J. 1991. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. Transfusion 31:521-6

Styler MJ, Topolsky DL, Crilley PA. 1992. Transient high grade heart block following autologous bone marrow infusion. Bone Marrow Transplant 10:435-8

Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Landsdorp PM. 1989. Charakterisation and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. Blood 74(5):1563-1570

Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. 1990. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. Proc Natl Acad Sci USA 87:3584-3588 Medical sciences

Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdorp PM, Thacker JD, Hogge DE. 1991. Differential Regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. Blood 78(3):666-672

Sztein JM, Noble K, Farley JS, Mobraaten LE. 2001. Comparison of permeating ans nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology 42(1):28-39 (Abstract)

Thalmeier K, Meißner P, Reisbach G, Falk M, Brechtel A, Dörmer P. 1994. Establishment of two permanent human bone marrow stromal cell lines with long-term post irradiation feeder capacity. Blood 83(7):1799-1807

Thalmeier K, Meißner P, Reisbach G, Hültner L, Mortensen BT, Brechtel A, Oostendorp RAJ, Dörmer P. 1996. Constitutive and modulated cytokine expression in two permanent human bone marrow stromal cell lines. Experimental hematology 24:1-10

Udomsakdi C, Lansdorp PM, Hogge DE, Reid DS, Eaves AC, Eaves CJ. 1992. Characterization of primitive Hematopoietic cells in normal human peripheral blood. Blood 80(10): 2513-2521.

Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Fujikawa S, Kanagawa H. 1992. Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. J Reprod Fertil 96(2):793-802. Abstract

Walter Z, Szostek M, Weglarska D, Raguszewska D, Jablonski M, Lorenz F, Skotnicki AB. 1999. Methods for freezing , thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. Przegl Lek 56(Suppl 1):34-9. Abstract

Winton EF, Colenda KW. 1987. Use of long-term human marrow cultures to demonstrate progenitor cell precursors in marrow treated with 4-Hydroperoxycyclophosphamide. Experimental Haematology 15:710-714

Yellowlees P, Greenfield C, McIntyre N. 1980. Dimethylsuphoxide-induced toxicity. Lancet 2:1004-6

Yokomise H, Inui K, Wada H, Hasegawa S, Ohno N, Hitomi S. 1995. Reliable cryopreservation of trachea for one month in a new trehalose solution. Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery 110(2):382-5

Yoon YH, Pope JM, Wolfe J. 1998. The effects of solutes on the freezing properties of and hydration forces in lipid lamellar phases. Biophysical journal 74:1949-1965

Zhang XB, Li K, Yau KH, Tsang KS, Fok TF, Li CK, Lee SM, Yuen PM. 2003. Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFU's, long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells. Transfusion 43:265-272

8. Abkürzungsverzeichnis

BFU-E: burst-forming-unit-erythroid, multizentrische rote Kolonien, entstanden aus einer frühen Vorläuferzelle der Erythropoese

CFU: Colony-forming-unit, kolonie-bildende Einheit

CFU-E: colony-forming-unit-erythroid, unizenrische rote Kolonien, entstanden aus einer späten Vorläuferzelle der Erythropoese

CFU-G: colony-forming-unit-granulocyte, entstanden aus einer späten Vorläuferzelle der Granulopoese

CFU-GEMM: colony-forming-unit-granulocyte-erythrocyte-macrophage, gemischte Kulturen mit Zellen aller Zellreihen, entstanden aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle der Myelo-, Erythro- und Megakaryopoese

CFU-GM: colony-forming-unit-granulocyte-macrophage, gemischte weiße Kulturen, entstanden aus einer frühen Vorläuferzelle der Granulopoese und der Makrophagen

CFU-M: colony-forming-unit-macrophage, späte Vorläuferzelle der Makrophagen

DMSO: Dimethylsulfoxid

FCS: fetal calf serum, fetales Kälberserum

KMT: Knochenmarktransplntation

LD: Low Density; Knochenmark geringer Dichte, das durch Zentrifugation von nativem Knochenmark über einem Ficoll-Dichtegradienten angereichert wurde

L: Layer = Feeder-Layer

LTC: Long-term-culture, Langzeitkultur (mindestens 5-wöchige Kultur auf einer Stromazellschicht)

LTCIC: Long-term-culture-initiating cell; Zelle, die nach 5 Wochen in Kultur im Methylzellulose-Assay noch Kolonien bildet

M: mol/l, molar

MC: Methylcellulose

ml: Milliliter

µl: Mikroliter

NaCl : Natrium-Clorid

PBSC: peripheral blood stem cells = periphere Blutstammzellen

PBSCT: Transplantation peripherer Blutstammzellen

RIA: Radioimmunoassay

rpm: rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

SCT: stem cell transplantation = Stammzelltransplantation

TC: Tissue Culture, Gewebekultur

Ü: Überstand

9. Danksagung

Allen, die das Zustandekommen dieser Arbeit unterstützt haben gilt mein herzlicher Dank.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Michael Schleuning danken für die Überlassung des Themas, für die über die gesamte Entstehungszeit stets gewährte Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, sowie für den zugestandenen Freiraum bei Planung und Ausführung der Arbeit, für seine konstruktive Kritik, ebenso wie für die grosszügige Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor.

Frau Dr. Susanne Kappicht danke ich insbesondere für die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten, sowie für ihre freundliche und motivierende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dörmer, der durch seine Anregungen, ebenso wie durch die zeitweiligen Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor diese Arbeit sehr gefördert hat.

Frau Elisabeth Spitzer möchte ich ganz besonders herzlich danken für die freundliche stets gewährte Unterstützung in den praktischen Dingen der Labortätigkeit, sowie für die angenehme Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt dahingehend auch Frau Karin Oettrich und Frau Vera Brumme.

Das Team der KMT hat durch die unkomplizierte Bereitstellung der Knochenmarksproben die Durchführung dieser Arbeit sehr erleichtert. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

In besonderem Masse danke ich den Patienten und gesunden Spendern, deren Knochenmark Grundlage dieser Arbeit ist, und hoffe, dass sie oder Menschen in ähnlichen Situationen von dieser Arbeit profitieren werden.

Ganz besonders und nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihr stets gewährtes Verständnis und ihre Unterstützung auch während meines gesamten Studiums danken.

10. Lebenslauf der Verfasserin

Name: Christine Scheinkönig

geboren am: 17.5.1976 in München

Schulbildung:

1982 - 1986: Burmester-Grundschule in München

1986 - 1995: Willi-Graf-Gymnasium in München

Abiturnote:1,9

Studium der Humanmedizin:

1996 - 1998: Ludwig Maximilian Universität in München

April 1998: Ärztliche Vorprüfung

danach: Technische Universität München

März 1999: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3,0)

April 2001: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,33)

23.April.2001 – April 2002: Praktisches Jahr:

Innere Medizin und Chirurgie am Krankenhaus Barmherzige Brüder München

Wahlfach: Gynäkologie und Geburtshilfe am Kinikum Recht der Isar

April 2002: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)

Gesamtnote: 1,99

Seit März 03: Erwerb des US-amerikanischen Medizinexamens (USMLE)

Promotion:

1998 - 2004:

Promotion bei Prof. M. Schleuning in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Universitätsklinikums Großhadern

Thema:

Untersuchungen zur Kryokonservierung hämatopoetischer Stammzellen aus menschlichem Knochenmark mit Trehalose

Berufstätigkeit:

01.08.2002 bis 28.02.03 Ärztin im Praktikum in der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung des Krankenhauses München Schwabing

München, 2004