

**GESINE KÖGLER und PETER WERNET**

## **Pluripotenz humaner Stammzellen aus Nabelschnurblut: Eine Basis für regenerative Therapien**

### **Einleitung**

Somatische Stammzellen, die sofort verfügbar sind und in großen Mengen bei gleichzeitigem Erhalt der Differenzierungsfähigkeit produziert werden könnten, wären eine ideale Ressource für die Entwicklung zellulärer Therapeutika für die regenerative Medizin.<sup>1</sup>

Obwohl die *embryonalen* Stammzellen das breiteste Differenzierungspotenzial besitzen, können sie derzeit nicht für einen klinischen Zellersatz verwendet werden, da sie sowohl im undifferenzierten als auch im differenzierten Zustand Teratome oder hoch maligne Teratokarzinome bilden,<sup>2</sup> so genannte *imprinting-related* Entwicklungsstörungen aufweisen<sup>3</sup> und ethisch bedenklich sind. Sollten jemals embryonale Zellen zur Therapie am Menschen eingesetzt werden, muss zuvor sichergestellt sein, dass sich darunter keine einzige unreife Stammzelle mehr befindet. Da die embryonalen Stammzellen bei der Differenzierung in die unterschiedlichen Gewebetypen wie alle anderen adulten Zellen so genannte Gewebemerkmale (u. a. HLA-Klasse I) exprimieren, müsste ein riesiger Pool an embryonalen Stammzellen zur Verfügung stehen (mehr als 100.000), um für jeden Patienten einen entsprechenden Gewebeersatz zur Verfügung zu stellen. Alternativ müsste die als „Therapeutisches Klonen“ sehr unglücklich bezeichnete Technik robust etabliert werden können, um Stammzelllinien durch den gezielten Transfer der Zellkerne von somatischen Zellen in „entkernte“ Oozyten derselben Spezies funktionell intakt herstellen zu können, um nicht nur die gewünschte Pluripotenz, sondern gleichzeitig den individuell erforderlichen Gewebetyp und die damit verbundene Transplantierbarkeit zu erreichen. Dieser experimentelle Ansatz erweist sich bis heute, also auch in der Nach-„Dolly“-Ära, als technisch und biologisch äußerst anspruchsvoll und ist weit entfernt von einer Einschätzbarkeit systematischen Gelingens. Darüber hinaus wäre es weniger dramatisch und wissenschaftlicher, Zelllinien, die mit Hilfe einer solchen Kerntransfertechnologie entstehen, mit dem Begriff Nukleartransfer-Stammzelllinien zu bezeichnen als mit der bisherigen und missverständlichen Terminologie des „Therapeutischen Klonens“.

Daneben hat in den letzten drei Jahren eine Reihe von Publikationen beschrieben, dass hämatopoetische Zellen aus dem adulten Knochenmark oder Blut vereinzelt auch zu nicht hämatopoetischen Zellen im Gewebe differenzieren können.<sup>4</sup> Neuere Daten zeigten jedoch, dass einige dieser Ergebnisse nicht reproduzierbar sind und die so genannte „Plastizität“ von Knochenmarkzellen eher ein seltenes Ereignis und daher von geringer physiologischer Relevanz ist.<sup>5</sup>

---

<sup>1</sup> Vgl. Kuehnle *et al.* (2002).

<sup>2</sup> Vgl. Erdo *et al.* (2003).

<sup>3</sup> Vgl. Sapienza *et al.* (2002).

<sup>4</sup> Vgl. Krause *et al.* (2001).

<sup>5</sup> Vgl. Wagers *et al.* (2002).

## Biologische Vorteile von Nabelschnurblut gegenüber adultem Knochenmark und Blut

Nabelschnurblut zeichnet sich gegenüber Knochenmark durch einen höheren Gehalt an hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus. Insbesondere der Anteil früher Zellen, die in *In-vitro*-Assays wie dem *Long Term Culture-Initiating Cell*-Assay (LTC-IC-Assay) und dem *High Proliferative Potential-Colony Forming Cell*-Assay (HPP-CFC-Assay) oder *in vivo* auf Grund ihres Potenzials, NOD/SCID-Mäuse zu repopulieren, nachgewiesen werden, ist im Nabelschnurblut deutlich erhöht.<sup>6</sup> Entsprechend ist die erforderliche Zelldosis für eine erfolgreiche Nabelschnurbluttransplantation von Patienten nach myeloablativer Therapie im Vergleich zu Knochenmark und mobilisiertem peripheren Blut zehnbis 100fach geringer. Darüber hinaus zeigen *Ex-vivo*-Expansionsexperimente und Studien zur Telomerlänge, dass hämatopoetische Nabelschnurblutstammzellen im Vergleich zu Stammzellen aus Knochenmark oder mobilisiertem peripheren Blut eine höhere Proliferationskapazität und eine entsprechend längere Lebensdauer besitzen.<sup>7</sup>

## Die José-Carreras-Stammzellbank am Universitätsklinikum Düsseldorf

Die José-Carreras-Stammzellbank am Universitätsklinikum Düsseldorf besteht seit 1992/1993, wurde von 1996 bis 2000 von der Deutschen José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. unterstützt und konnte sich damit zur größten Stammzellbank Europas entwickeln.<sup>8</sup> Nabelschnurblut erhalten wir in Düsseldorf aus 30 kooperierenden Frauenkliniken. Das Nabelschnurblut wird nach der Abnabelung des Kindes gewonnen, ohne dass eine Gefahr für Kind und Mutter gegeben ist; sowohl die Abnahme als auch die Verwendung sind ethisch unbedenklich. Weiterer Vorteil ist, dass Nabelschnurblut immer verfügbar ist, es immunologisch gut verträglich ist und viele Krankheitserreger, wie bestimmte Viren (u. a. Epstein-Barr-Virus (EBV) und Cytomegalievirus (CMV)), im Nabelschnurblut fast nicht vorhanden sind.<sup>9</sup> Nabelschnurblut zum allogenen Knochenmarkersatz wird unter Raumbedingungen nach Arzneimittelgesetz aufgearbeitet, kryokonserviert und kann so jahrelang gelagert werden. Düsseldorf hat alle Voraussetzungen für die klinische Anwendung, wie die Zulassung durch das Paul-Ehrlich-Institut als Arzneimittel, eine Herstellungserlaubnis der lokalen Bezirksregierung sowie als besonderes Alleinstellungsmerkmal in Deutschland die internationale FACT/NETCORD-Akkreditierung. Bis September 2004 wurden bereits 227 allogene (unverwandte) Nabelschnurbluttransplantate der Düsseldorfer Stammzellbank weltweit bei Patienten mit bösartigen Bluterkrankungen wie Leukämien, Stoffwechsel- und Immundefekterkrankungen eingesetzt. Zurzeit lagern über 8.000 Nabelschnurbluttransplantate für die unverwandte Spende sowie gerichtete Transplantate bei Indikation innerhalb der Familie in Düsseldorf. Mit einer Überlebensrate von 42 Prozent nach zwei Jahren bei einem Hochrisikokollektiv, das keinen kompatiblen Familien- oder Fremdspender hatte und deshalb mit ein oder mehreren HLA<sup>10</sup>-(Gewebe-)

<sup>6</sup> Vgl. Migliaccio *et al.* (1986).

<sup>7</sup> Vgl. Vaziri *et al.* (1994).

<sup>8</sup> Vgl. Kögler *et al.* (1999) sowie Kögler *et al.* (2002).

<sup>9</sup> Vgl. Kögler *et al.* (1999).

<sup>10</sup> *Humane Leucocyte Antigen*.

Inkompatibilitäten transplantiert wurde, sind diese Ergebnisse inzwischen so gut wie bei der unverwandten Knochenmarktransplantation. Weltweit wurden bisher über 3.000 Patienten mit unverwandtem Nabelschnurblut bzw. Nabelschnurblut gewebeverträglicher Geschwisterkinder transplantiert.<sup>11</sup> Eine Tumorentstehung durch die transplantierten Nabelschnurblutzellen wurde bei dieser Stammzellressource bisher weder bei einer Transplantation noch in Tiermodellen<sup>12</sup> beobachtet.<sup>13</sup> Die weltweit größten Stammzellbanken haben sich zur Internationalen NETCORD-Foundation mit einem gemeinsamen Qualitäts- und Akkreditierungsstandard zusammengetan. Mit erheblichen finanziellen Mitteln der EU konnte dazu eine moderne Informatikplattform, das inzwischen als weltweiter Standard in Echtzeit operierende *Virtual Office* der NETCORD-Organisation, in Düsseldorf entwickelt und installiert werden.<sup>14</sup> Damit können patientenspezifische Anfrageprofile sofort abgerufen und über komplett elektronisch verlaufende Arbeitsabläufe rasch beantwortet werden.<sup>15</sup>

### **Unrestringierte somatische Stammzellen (USSCs) aus dem Nabelschnurblut**

Über das Vorhandensein nicht hämatopoetischer Stammzellen im Nabelschnurblut war bis vor wenigen Jahren nichts bekannt. Eigene Arbeiten konnten als erste belegen, dass Nabelschnurblut pluripotente Stammzellen enthält, die *in vitro* und *in vivo* in unterschiedliche Gewebe differenziert werden können.<sup>16</sup> Diese nicht hämatopoetischen Zellen, die wir als *unrestricted somatic stem cells* (USSCs) bezeichnen, haben primär eine sehr niedrige Frequenz mit im Mittel vier Kolonien (Bereich von einer bis elf Kolonien) pro 50 bis 100 ml Nabelschnurblut. Diese Stammzellpopulation wächst als adhärenter Monolayer und zeigt eine spindelförmige Morphologie mit einer Größe der Einzelzelle von 20 bis 25  $\mu\text{m}$  (Abb. 1A). Diese USSCs können über 20 Passagen (äquivalent zu 46 *population doublings*) bis zu einer Zellzahl von  $10^{15}$  amplifiziert werden (Abb. 1B). Für die USSCs konnte auch nach 19 Passagen noch ein normaler Karyotyp (46XX oder 46XY) nachgewiesen werden. USSCs sind negativ für die Oberflächenantigene CD14, CD33, CD34, CD45, CD49b, CD49c, CD49d, CD49f, CD50, CD62E, CD62L, CD62P, CD106, CD117, Glycophorin A und HLA-DR, exprimieren jedoch CD13, CD29, CD44, CD49e, CD90, CD105, Vimentin, Cytokeratin 8 und 18, humanes Endo, niedrige Level an CD10 sowie FLK1 (KDR) und zeigen variable, aber schwache Expression von HLA-ABC. Die Analyse der Telomerlänge zeigt eine deutliche Korrelation zum Alter der untersuchten Zellen. Die durchschnittliche Telomerlänge der USSCs ist mit 8,93 kbp nach 25 *population doublings* deutlich länger als die adulter mesenchymaler Stammzellen mit 7,11 kbp, gewonnen von 30 Jahre alten Knochenmarkspendern.<sup>17</sup>

<sup>11</sup> Vgl. Wernet (2004).

<sup>12</sup> Vgl. Kögler *et al.* (2004).

<sup>13</sup> Weitere Informationen über diese allogene Nabelschnurblutbank sind über <http://www.stammzellbank.de> (29.11.2004) verfügbar.

<sup>14</sup> Vgl. Wernet (2004).

<sup>15</sup> Weitere Informationen können über <http://www.netcord.org> (04.11.2004) abgerufen werden.

<sup>16</sup> Vgl. Kögler *et al.* (2004).

<sup>17</sup> Vgl. Kögler *et al.* (2004).

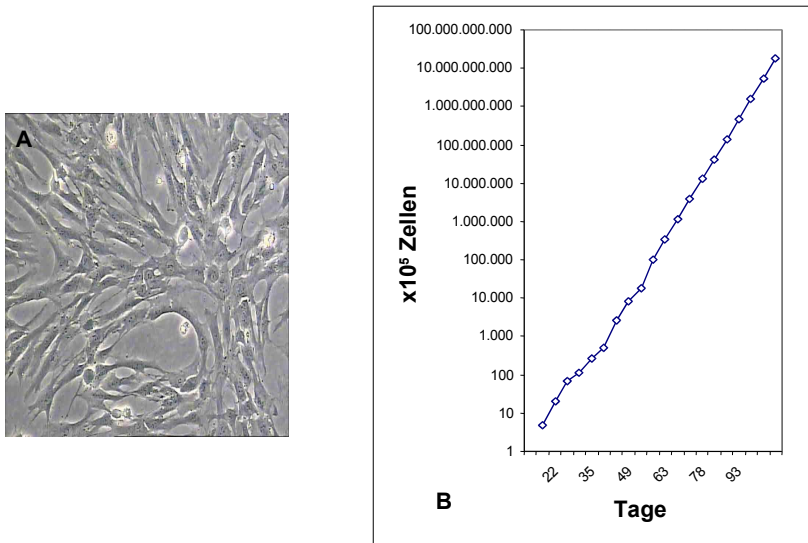


Abb. 1: Morphologie (A) und Expansion (B) adhärenter USSCs aus Nabelschnurblut.

### ***In-vitro-* und *In-vivo-*Differenzierung der USSCs in osteoblastäre, chondrozytäre und adipozytäre Richtung**

Alle analysierten USSCs konnten in osteoblastäre, chondrozytäre und adipozytäre Richtung differenziert werden. In der Gegenwart von Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat bilden sich so genannte Nodule, für die durch Alizarin-Rot-Färbung eine Kalzifizierung nachgewiesen werden konnte, ein Indikator für die Bildung funktionell kompetenter Osteoblasten (Abb. 2A). Die Induktion der mRNA von Osteocalcin, knochen-spezifischer alkalischer Phosphatase, Osteopontin, Bone-sialoprotein, PDGF-R $\alpha$  (*Platelet Derived Growth Factor-Receptor- $\alpha$* ) sowie der gemessene Anstieg der Alkalischen Phosphatase und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung untermauern die histochemischen Ergebnisse. Darüber hinaus konnten die USSCs durch eine „Pelletkultur“ in Dexamethason, Prolin, Natrium-pyruvat, IST und Premix sowie TGF $\beta$ 1 in Chondrozyten differenziert werden. Nach 14 Tagen exprimierten die Zellen die für Chondrozyten spezifischen Cart-1, Kollagen Typ II und Chondroadherin mRNAs. Die Kollagen-Typ-II-Expression sowie der Nachweis der extrazellulären Matrix durch Alzianblau nach chondrogener Induktion sind in Abbildung 2B illustriert. In der Gegenwart von Dexamethason, Insulin, IBMX und Indomethacin bildeten sich hingegen Fettzellen. Der Nachweis erfolgte mit der Oil-Red-O-Färbung (Abb. 2C).

Um die *In-vivo*-Regenerationsfähigkeit der USSCs in Knochen zu zeigen, wurde in Kooperation mit Prof. A. Caplan (Cleveland, Ohio, USA) der so genannte kritische Knochen-defekt im Rattenfemur als Modell verwendet.<sup>18</sup> Hierfür wurden USSCs auf einer Matrix von Tricalciumphosphat kultiviert und in den kritischen Knochendefekt der athymischen

<sup>18</sup> Vgl. Bruder *et al.* (1998).

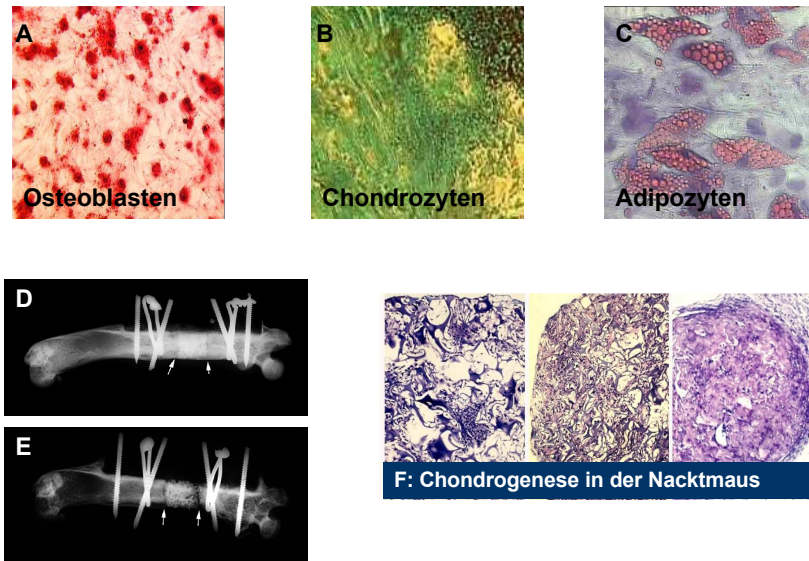


Abb. 2: Differenzierung der USSC in mesenchymale Richtung. Bildung kalzifizierter Nodule (Alizarin-Rot-positiv) nach Induktion mit Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat der USSC (A), Nachweis der typischen extrazellulären Matrix nach chondrogener Induktion mit Dexamethason, Prolin, Natriumpyruvat, IST und Premix, TGF $\beta$ 1 und Anfärbung mit Alcianblau (B). Entwicklung von Fettzellen (Öl-Rot-O-positiv) aus USSC (C). Osteoinduktion des Kritischen Knochendefekts der athymischen Harlan-Nackratte nach Kultivierung der USSC auf Tricalciumphosphat (D) sowie das zellfreie Implantat in diesem Defekt als Kontrolle (E). Chondrogene Differenzierung der USSC in der Nacktmaus: Mit USSC beladene Gelatinschwämme zeigen eine starke chondrogene Differenzierung, die sich durch Toluidinblaufärbung nachweisen lässt (F).

Harlan-Nackratte eingesetzt. Nach zwölf Wochen konnte eine deutliche Knochenrekonstitution beobachtet werden (Abb. 2D). Zellfreie Implantate dienten als Negativkontrolle (Abb. 2E). Für die Analyse des chondrogenen Differenzierungspotenzials wurden die mit USSCs beladenen Gelatinschwämme (4x4 mm, Gelfoam<sup>®</sup>, Upjohn Pharmacia) mit TGF- $\beta$  (5 ng/ml) für zwei Wochen kultiviert und in Nacktmäuse implantiert.<sup>19</sup> Nach drei Wochen zeigten die implantierten Zellen eine starke chondrogene Differenzierung, die durch Toluidinblaufärbung nachgewiesen werden konnte (Abb. 2F).

### ***In-vitro-* und *In-vivo-*Differenzierung der USSCs zu neuronalen Zellen**

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Molekulare Neurobiologie“ (Univ.-Prof. Dr. H. W. Müller, Dr. C. Rosenbaum und S. Greschat) der Klinik für Neurologie (Direktor: Univ.-Prof. H. P. Hartung) der Heinrich-Heine-Universität wurden die USSCs

<sup>19</sup> Vgl. Ponticello *et al.* (2000).

in Gegenwart von Retinolsäure, BFGF (*Basic fibroblast growth factor*) und dem Nervenwachstumsfaktor  $\beta$  (XXL Medium) kultiviert, und es entwickelten sich Zellen, die entweder typische Marker von Astrozyten oder Neuronen exprimierten. Untersuchungen zeigen, dass nach neuraler Induktion 30 Prozent aller Zellen nach einer Woche und 70 Prozent aller Zellen nach vier Wochen typische Marker von Neuronen, wie Neurofilament, exprimieren (Abb. 3A). Durch eine Doppelmarkierung konnte eine Kolokalisation von Neurofilament

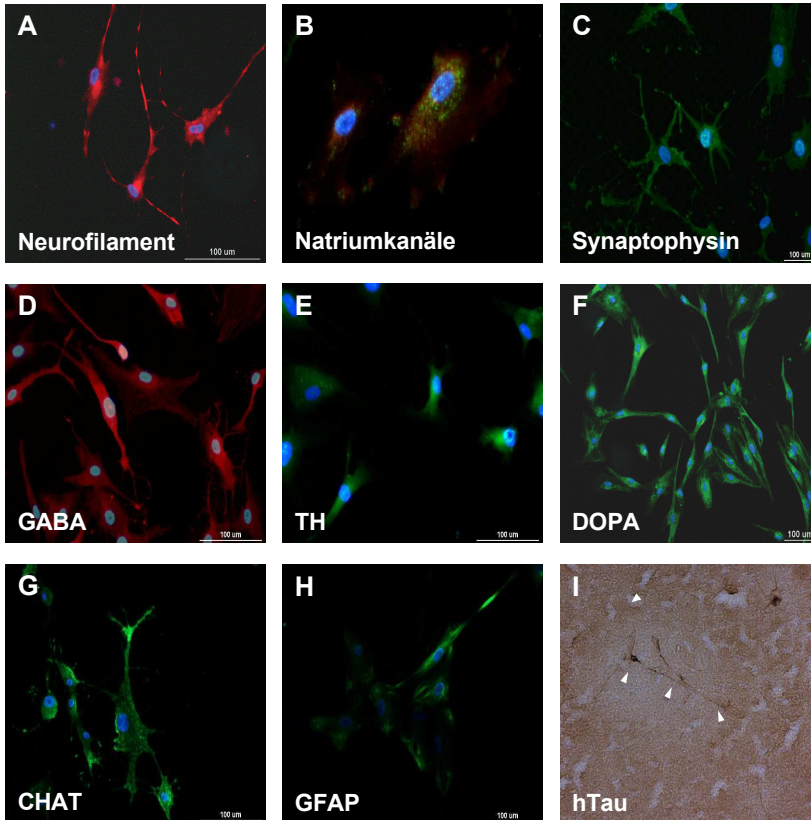


Abb. 3: Differenzierung der USSC in neurale Zellen *in vitro* und *in vivo*: Neurofilament (A), Doppelmarkierung für die Natriumkanäle (grün) sowie Neurofilament (rot, B), Synaptophysin (C), GABA (D), Tyrosinhydroxylase (E), DOPA (F), Cholinacetyltransferase (G), GFAP (H) nach neuraler Induktion *in vitro*. Die Gegenfärbung der Kerne mit DAPI ist blau dargestellt. I zeigt eine positive Färbung der USSC für das humane Tau-Protein im ipsilateralen Kortex drei Monate nach stereotaktischer Implantation in die Hippocampusregion.

und für die Erregungsleitung wichtige Natriumkanäle nachgewiesen werden (Abb. 3B). Synaptophysin, ein Protein in den synaptischen Vesikeln, war nach vier Wochen vorhanden (Abb. 3C). 90 Prozent der Zellen waren positiv für den inhibitorischen Transmitter

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA, Abb. 3D). Desweiteren konnte der Transmitter Cholinacetyltransferase (Abb. 3E) und damit cholinerge Neurone sowie Tyrosinhydroxylase (Abb. 3F) und Dopadecarboxylase (Abb. 3G) und damit Enzyme für die Synthese von Dopamin nachgewiesen werden, eine wichtige Vorstufe für die Entwicklung dopaminerger Neuronen. USSCs differenzierten ebenfalls in Astrozyten (Abb. 3H), was durch das Vorkommen des intermediären Filaments GFAP (*glial fibrillar acid protein*) mit einem Maximum von 45 Prozent nach zwei bis drei Wochen nachgewiesen werden konnte. Für die Analyse, ob sich USSCs *in vivo* in neuronale Zellen entwickeln, d. h. migrieren, integrieren und differenzieren, wurden die undifferenzierten Zellen mit pKH26 markiert und stereotaktisch in die Hippocampusregion in das adulte Hirn von Wistarratten implantiert. Drei Monate nach Transplantation waren humane Zellen nachweisbar, die das humanspezifische Protein Tau exprimierten (Abb. 3I). Die Tau-positiven Zellen zeigten eine neuronale, differenzierte Morphologie der implantierten USSCs in unterschiedlichen Ipsi- und Contralateralregionen des Gehirns einschließlich des Neokortex.<sup>20</sup>

### ***In-vivo*-Differenzierung der USSCs zu Kardiomyozyten und Purkinjellen im fötalen Schafmodell**

In Kooperation mit Prof. E. Zanjani (Reno, Nevada, USA) wurden undifferenzierte USSCs in das Peritoneum von 56 bis 60 Tage alten präimmunen Schafföten appliziert, und die Differenzierung in Kardiomyozyten und Purkinjellen wurde acht Monate nach Transplantation analysiert. Der Vorteil dieses Schafmodells ist es, dass humane Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation nicht abgestoßen werden können und in diesem *Non-injury*-Modell die fötale Entwicklung, Integration und Differenzierung in die Organe nachvollzogen werden kann. Zum Nachweis humaner Zellen wurde in Kooperation mit J. Airey (Reno) ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen humanes *heat shock protein 27* (HSP 27) eingesetzt. Dieser Antikörper zeigte keine Reaktivität mit Schafferzen, markierte jedoch spezifisch humanes Herzgewebe. HSP-27-positive humane Zellen waren nach Transplantation in beiden Atria (Abb. 4A), beiden Ventrikeln (Abb. 4B) und dem Septum nachweisbar, was auf ein robustes Entwicklungspotenzial der USSCs in diesem Modell schließen lässt. Doppelmarkierungen mit Anti-Ryanodinrezeptor (ein Rezeptor, der für die Calciumfreisetzung vom sarkoplasmatischen Retikulum in Muskelzellen verantwortlich ist), Anti-Myosin *heavy chain* und, wie in Abbildung 4D gezeigt, Anti-Dystrophin dokumentieren, dass es sich um Kardiomyozyten handelt. Die Verteilung der humanen Zellen im Herzen war nicht gleichmäßig: Es gab Gebiete, in denen zehn bis 20 Prozent der Zellen humanen Ursprungs und inmitten von Schafkardiomyozyten gelagert waren (Abb. 4E), die Quantität lag im Schnitt zwischen null und drei Prozent. Zusätzlich konnte durch Immunzytochemie mit einem spezifischen Antikörper (PGP 9.5) nachgewiesen werden, dass die USSCs auch in Purkinjefasern, also in Zellen, die an der Erregungsleitung beteiligt sind, differenzieren können (Abb. 4F). Dass die USSCs sowohl in Kardiomyozyten als auch in Purkinjefasern differenzieren können, unterscheidet sie von adulten mesenchymalen Zellen, die im Gegensatz zu den USSCs nur eine sehr geringe Differenzierung zu Kardiomyozyten (weniger

---

<sup>20</sup> Vgl. Kögler *et al.* (2004).

als 0,01 Prozent) zeigten,<sup>21</sup> was auf einen ontogenetisch früheren Entwicklungsstand der USSCs zurückzuführen ist.

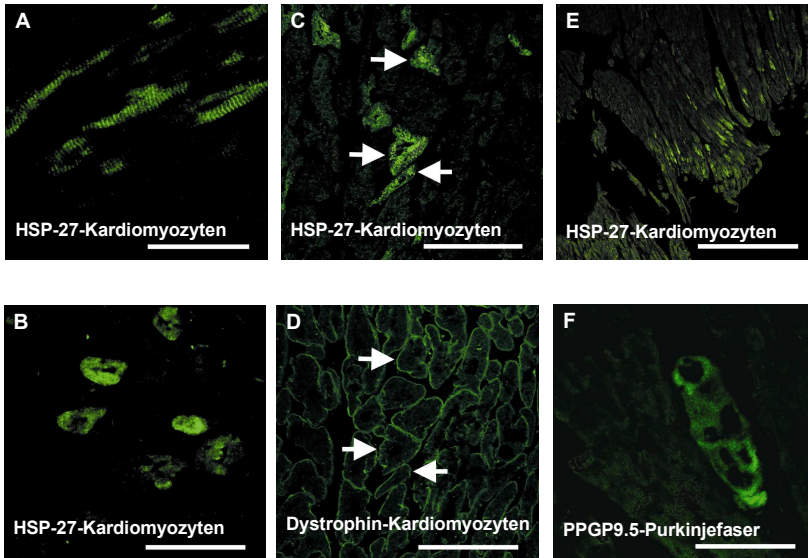


Abb. 4: *In-vivo*-Differenzierung der USSC in Kardiomyozyten und Purkinjefasern im präimmunen Schafmodell. (A) und (B) zeigen Gruppen an humanen Zellen im Longitudinalschnitt (A) sowie im Querschnitt (B) des rechten Ventrikels, die mit dem humanspezifischen Antikörper HSP 27 markiert sind. (C) zeigt eine Markierung mit HSP 27 und (D) eine Markierung mit Anti-Dystrophin. Die Pfeile markieren die gleichen Zellen. (E) zeigt ein Gebiet des linken Ventrikels, in dem große Gebiete humanen Ursprungs sind. (F) zeigt eine spezifische Markierung einer Purkinjefaser.

### ***In-vivo*-Differenzierung der USSCs zu Hepatozyten im fötalen Schafmodell**

Zum Nachweis von humanen Hepatozyten in der Schafleber 14 Monate nach Transplantation wurden diese mit einem humanen hepatozytenspezifischen monoklonalen Antikörper OCH1E5 angefärbt. Sowohl im Leberparenchym (Abb. 5A) als auch um die Portalvenen (Abb. 5B) waren humane Hepatozyten mit einem Anteil von  $21,1 \pm 3,2$  Prozent des Gewebes nachweisbar. Um die physiologische Funktionsfähigkeit dieser humanen Zellen zu dokumentieren, wurde mit dem humanspezifischen monoklonalen Antikörper HSA-11, der humanes Albumin erkennt, eine zusätzliche Färbung durchgeführt (Abb. 5C). Sowohl in dieser Zytochemie wie auch im Westernblot des Serums der Schafe 17 Monate nach Transplantation (Abb. 5D) konnte humanes Albumin nachgewiesen werden. Zur Analyse,

<sup>21</sup> Vgl. Airey *et al.* (2004).



inwieweit die integrierten humanen Zellen *de novo* oder durch Fusion mit dem Schafleberparenchym entstanden waren, wurden einzelne Zellen des chimären Gewebes, gewonnen durch *Laser-Capture-Mikroskopie*, auf die Koexistenz von Schaf und humanem Genom hin analysiert. Dazu wurden spezifische Primer für IGH- und TCR-Lozi mit Schaf- oder humanem Ursprung analysiert. Die Analyse wurde an Zellen des chimären Gewebes durchgeführt, die mit dem humanen hepatozytenspezifischen Antikörper OCH1E5 vorgefärbt waren. In 24 auswertbaren Zellen konnte nur ein PCR-Produkt humaner DNA, aber keine Schaf-DNA nachgewiesen werden. Umgekehrt zeigte die Koamplifikation an Schafzellen des chimären Gewebes, das für OCH1E5 negativ war, nur ein PCR-Produkt an Schaf- und nicht humaner DNA. Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass Fusionsereignisse unter physiologischen *Non-injury*-Bedingungen ein extrem seltenes Ereignis sind und nicht der Grund für die hier gezeigte Regenerationsfähigkeit der USSCs sein können.

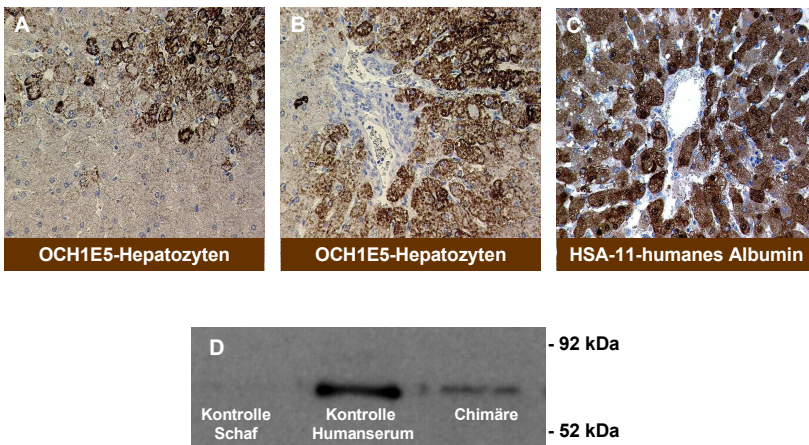


Abb. 5: *In-vivo*-Differenzierung der USSC in Leberparenchym im präimmunen Schafmodell. (A) und (B) dokumentieren die positive Anfärbung der Leberparenchymzellen mit dem für humane Hepatozyten spezifischen Antikörper OCH1E5. (A) dokumentiert die Anfärbung direkt im Gewebe und (B) zeigt, dass die Mehrzahl der Zellen um die Portalvenen positiv markiert ist. (C) verdeutlicht, dass die humanen Leberparenchymzellen Albumin sekretieren, was durch den monoklonalen Antikörper HSA-11 nachgewiesen wurde. (D) Westernblot für humanes Albumin in Humanserum, Serum der chimären Schafe und Kontrollschafserum.

## Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass eine intrinsisch pluripotente Stammzellpopulation im Nabelschnurblut existiert, die sich sehr gut vermehren lässt, unterschiedliche Differenzierungsmöglichkeiten hat, im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen keine Tumoren bzw. Teratome induziert und damit eine ganz neue Perspektive für die Geweberegeneration darstellt. Obwohl die USSC ein breites Differenzierungspotenzial hat, müssen Transduktionsversuche mit rekombinanten retroviralen Vektoren zeigen,

ob es sich bei der USSC um eine primär klonale Population handelt, oder ob Zellen unterschiedlicher Keimblätter (Ektoderm, Endoderm, Mesoderm) zu diesem breiten Differenzierungspotenzial beitragen.

Da der mögliche Einsatz der USSC vorwiegend als Zelltherapeutikum im allogenen Bereich stattfinden würde, müssen Fragen der Immunreaktivität und der Immunogenität der USSC abgeklärt werden. Hier sollten zunächst die bisher in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation bewährten Gewebeverträglichkeitsverfahren erfolgreich Verwendung finden.

**Danksagung:** Wir möchten uns insbesondere bei den Koautoren der Publikation im *Journal of Experimental Medicine*<sup>22</sup> bedanken, die einen entscheidenden Anteil an der Durchführung des Projektes hatten und zu dessen Erfolg beigetragen haben: Dipl. Biologin Sandra Sensken, Dr. rer. nat. Thorsten Trapp, Dr. rer. nat. Rüdiger V. Sorg und Dr. Johannes Fischer (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Universitätsklinikum Düsseldorf); Univ.-Prof. Dr. Markus Müschen, Dipl. Biologe Niklas Feldhahn und Dipl. Biologin Stefanie Liedtke (Nachwuchsgruppe Stammzellbiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf); Univ.-Prof. Dr. Hans-Werner Müller, Dr. rer. nat. Claudia Rosenbaum und Susanne Greschat (Arbeitsgruppe für Molekulare Neurobiologie der Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Düsseldorf); Dr. Judith Airey und Dr. Evan Colletti (Department of Pharmacology, University of Nevada Medical School, Reno); Prof. Esmail Zanjani und Dr. Graca Almeida-Porada (Veterans Administration Medical Center, University of Nevada, Reno); Prof. Arnold Caplan und Dr. Jizong Gao (Skeletal Research Center, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio).

## Literaturverzeichnis

- AIREY, J. A., G. ALMEIDA-PORADA, E. J. COLLETTI, C. D. PORADA, J. CHAMBERLAIN, M. MOVSESIAN, J. L. SUTKO und E. D. ZANJANI. „Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart“, *Circulation* 109 (2004), 1401-1407.
- BRUDER, S. P., N. JAISWAL, N. S. RICALTON, J. D. MOSCA, K. H. KRAUS und S. KADIYALA. „Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration“, *Clinical Orthopaedics* (1998), 247-256.
- ERDO, F., C. BUHRLE, J. BLUNK, M. HOEHN, Y. XIA, B. FLEISCHMANN, M. FOCKING, E. KUSTERMANN, E. KOLOSSOV, J. HESCHELER, K. A. HOSSMANN und T. TRAPP. „Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke“, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23 (2003), 780-785.
- KÖGLER, G., T. SOMVILLE, U. GOBEL, P. HAKENBERG, A. KNIPPER, J. FISCHER, O. ADAMS, C. KREMPE, C. MCKENZIE, H. RUTTIGERS, W. MEIER, O. BELLMANN, H. STRENG, A. RING, U. ROSSECK, V. ROCHA und P. WERNET. „Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD Bank Germany“, *Klinische Pädiatrie* 211 (1999), 224-232.
- KÖGLER, G., P. G. MIDDLETON, M. WILKE, V. ROCHA, B. ESENDAM, J. ENZMANN, P. WERNET, E. GLUCKMAN, S. QUEROL, L. LECCHI, E. GOULMY und A. M. DICKINSON. „Recipient cytokine genotypes for TNF-alpha and IL-10 and the minor histocompatibility antigens HY and CD31 codon 125 are not associated with occurrence or severity of acute GVHD in unrelated cord blood transplantation: a retrospective analysis“, *Transplantation* 74 (2002), 1167-1175.

<sup>22</sup> Vgl. Kögler *et al.* (2004).

- KÖGLER, G., S. SENSKEN, J. A. AIREY, T. TRAPP, M. MÜSCHEN, N. FELDHAHN, S. LIEDTKE, R. V. SORG, J. FISCHER, C. ROSENBAUM, S. GRESCHAT, A. KNIPPER, J. BENDER, O. DEGISTIRICI, J. GAO, A. I. CAPLAN, E. J. COLLETTI, G. ALMEIDA-PORADA, H. W. MULLER, E. ZANJANI und P. WERNET. „A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential“, *Journal of Experimental Medicine* 200 (2004), 123-135.
- KRAUSE, D. S., N. D. THEISE, M. I. COLLECTOR, O. HENEGARIU, S. HWANG, R. GARDNER, S. NEUTZEL und S. nJ. SHARKIS. „Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell“, *Cell* 105 (2001), 369-377.
- KUEHNLE, I. und M. A. GOODELL. „The therapeutic potential of stem cells from adults“, *British Medical Journal* 325 (2002), 372-376.
- MIGLIACCIO, G., A. R. MIGLIACCIO, S. PETTI, F. MAVILIO, G. RUSSO, D. LAZZARO, U. TESTA, M. MARINUCCI und C. PESCHLE. „Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac-liver transition“, *Journal of Clinical Investigation* 78 (1986), 51-60.
- PONTICIELLO, M. S., R. M. SCHINAGL, S. KADIYALA und F. P. BARRY. „Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy“, *Journal of Biomedical Materials Research* 52 (2000), 246-255.
- SAPIENZA, C. „Imprinted gene expression, transplantation medicine, and the ‘other’ human embryonic stem cell“, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99 (2002), 10243-10245.
- VAZIRI, H., W. DRAGOWSKA, R. C. ALLSOPP, T. E. THOMAS, C. B. HARLEY und P. M. LANS-DORP. „Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age“, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91 (1994), 9857-9860.
- WAGERS, A. J., R. I. SHERWOOD, J. L. CHRISTENSEN und I. L. WEISSMAN. „Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells“, *Science* 297 (2002), 2256-2259.
- WERNET, P. „The International NETCORD Foundation“, in: H. E. BROXMEYER (Hrsg.). *AABB press; cord blood biology, immunology, banking and clinical transplantation*. Bethesda, MD, 2004, 429-435.