

**Aus der Universitätsklinik für
Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Abteilung Kinderheilkunde I
*Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger***

***Klinisches Potential von mesenchymalen Stromazellen
bei neurometabolischen Krankheiten
in der Pädiatrie***

**Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Alexandra Staiber
aus Bad Friedrichshall**

2009

**Aus der Universitätsklinik für
Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Abteilung Kinderheilkunde I
*Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger***

***Klinisches Potential von mesenchymalen Stromazellen
bei neurometabolischen Krankheiten
in der Pädiatrie***

**Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Alexandra Staiber
aus Bad Friedrichshall**

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Dipl.- Biochem. Ingo Müller

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Bethge

Für meine Eltern und Geschwister

Erklärung

"Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Klinisches Potential von mesenchymalen Stromazellen bei neurometabolischen Krankheiten in der Pädiatrie“ selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

PD Dr. Dipl.- Biochem. Ingo Müller, Johanna Backes und Dr. rer. net. Birgit Kustermann, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mit der Arbeit wurde weder ein akademischer Grad erworben noch eine staatliche Prüfung absolviert. Den Grad eines Dr. med. habe ich noch nicht erworben.

Mir ist bekannt, dass falsche oder unvollständige Angaben zur Folge haben können, dass die Fakultät ein Verfahren zur Entziehung eines eventuell verliehenen akademischen Titels einleitet.“

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mesenchymale Stromazellen	1
1.1.1	Stammzellplastizität	2
1.1.2	Immunphänotypisierung	3
1.1.3	Transplantation von mesenchymalen Stromazellen	4
1.1.4	Immunologische Eigenschaften	5
1.2	Zellexpansion <i>in vitro</i> unter "GMP"-konformen Bedingungen	6
1.2.1	MSC-Gewinnung	6
1.2.2	FCS-freie Kultur	7
1.2.3	Mausmodell	8
1.3	Neurometabolische Krankheiten im Kindesalter	9
1.3.1	Sphingolipide	10
1.3.2	Lysosomen	12
1.3.3	Erkrankungen durch gestörten lysosomalen Sphingolipidabbau	15
1.3.4	Metachromatische Leukodystrophie (MLD)	16
1.3.5	GM ₁ -Gangliosidosen (β -Galaktosidosämie)	19
1.3.6	GM ₂ -Gangliosidosen	21
1.3.7	M. Sandhoff und die GM ₂ -A-Aktivatorprotein-Defizienz	22
1.3.8	Diagnostik lysosomaler Speicherkrankheiten	23
1.3.9	Therapieoptionen	24
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Abkürzungsverzeichnis	28
3.2	Material	29
3.2.1	Chemikalien/ Substanzen	29
3.2.2	Lösungen, Puffer, Medien	31
3.2.3	Antikörper, Lektine, Plasmide	35
3.2.4	Geräte	35
3.2.5	Verbrauchsmaterial	36
3.2.6	Verwendete Programme	36
3.2.7	Zellkultur	37
3.3	Methoden	37
3.3.1	Zellbiologische Techniken: MSC	37
3.3.2	Phänotypisierung mittels FACS-Analyse	39
3.3.3	Analyse der Oberflächenmarker	41

3.3.4	MTS-Proliferationsassay	42
3.3.5	Zusatz von Thrombozyten.....	44
3.3.6	Transfektion mit EGFP-Vektor durch Calcium-Phosphat-Präzipitation.....	45
3.3.7	Vervielfältigung des EGFP-tragenden Plasmids	46
3.3.8	Immunhistochemie GFP-transduzierter humaner MSC in paraffinisierten Gewebschnitten transplantiertter NOD/LtSz-Rag ^{-/-} -Mäuse	47
3.3.9	Transwellkultur	49
3.3.10	Bestimmung der Enzymaktivitäten im Medium.....	49
4	ERGEBNISSE.....	53
4.1	Schritte zur Optimierung der Kulturbedingungen	53
4.1.1	Morphologie.....	53
4.1.2	Phänotypisierung	55
4.1.3	Die Identifikation von MSC im Knochenmark.....	57
4.1.4	Der Einfluss des Kulturmediums auf die Expression der ausgewählten Oberflächenmarker	58
4.1.5	Der Einfluss des Kulturmediums auf die Proliferationsgeschwindigkeit	58
4.1.6	Proliferationsrate in Abhängigkeit vom Basismedium	59
4.1.7	Proliferationsrate in Abhängigkeit vom Serumzusatz.....	60
4.1.8	Andere Organische und anorganische Zusätze	61
4.2	Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation	62
4.3	Homing der GFP-transduzierten MSC in transplantierten NOD/LtSz-Rag^{-/-}-Mäusen	63
4.4	Enzymaktivitäten	65
4.4.1	Expression der vier untersuchten lysosomalen Enzyme	65
4.4.2	Arylsulfatase A-Abgabe durch MSC	66
4.4.3	Arylsulfatase A-Aufnahme durch MLD-Fibroblasten	67
5	DISKUSSION.....	68
5.1	Interpretation der Ergebnisse.....	69
5.1.1	Der Einfluss des Kulturmediums.....	69
5.1.2	Das Mausmodell: Transplantation GFP-transduzierter humaner MSC in NOD-LtSz- Rag ^{-/-} -Mäuse.....	71
5.1.3	Transfektionsversuche.....	72
5.1.4	Enzymaktivitäten	72
5.1.5	Ausblick.....	73
6	ZUSAMMENFASSUNG	76

1 EINLEITUNG

1.1 Mesenchymale Stromazellen

Das Knochenmark bringt als multifunktionelles Organ nicht nur hämatopoetische Stammzellen (HSC) hervor. Schon 1968 wurden im Knochenmark beheimatete multipotente Stromazellen beschrieben. Sie wurden wegen ihrer fibroblastenähnlichen, spindelförmigen Morphologie und der Eigenschaft, in Kultur adhärente Zellklone mit möglichem Übergang in verschiedene Phänotypen zu bilden, als *colony-forming units-fibroblastic* (CFU-F) definiert (Abb. 1-1)¹. Alternative Bezeichnungen sind mesodermale Progenitorzellen (*mesenchymal progenitor cells*; MPC), Knochenmarkstroma-Stammzellen (*bone marrow stromal stem cells*; BMSSC) oder stromale Knochenmarkszellen (*marrow stromal cells*, MSC).

Multipotente Stromazellen, im Folgenden MSC abgekürzt, nehmen den kleinen Anteil von nur 0,05 – 0,1% aller kernhaltigen Zellen in einer Knochenmark-aspiration ein. In den sinusoiden Markräumen bilden sie als supportives Stroma zusammen mit Makrophagen und mikrovaskulären Endothelzellen Proliferationsnischen, in denen sich hämatopoetische Vorläuferzellen unter dem regulativen Einfluss von Zytokinen und Zell-Zell-Interaktion entwickeln².

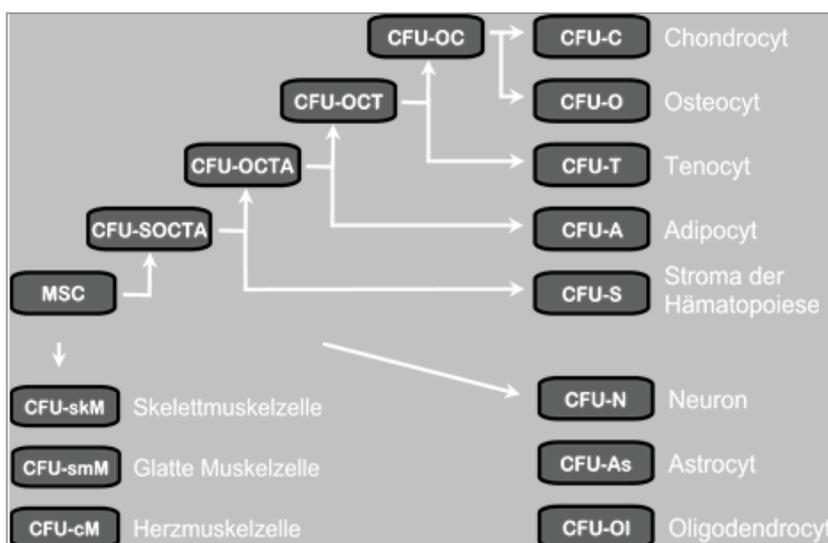


Abb. 1-1: Plastizität mesenchymaler Stammzellen (nach Friedenstein AJ et al., 1968).

Diesem Modell folgend konnte eine Co-Transplantation von hämatopoetischen und mesenchymalen Stromazellen die Wiederherstellung des blutbildenden Systems nach myeloablativer Hochdosischemotherapie bei Brustkrebs-Patientinnen beschleunigen und die für das erfolgreiche Engraftment erforderliche Menge an HSC verringern³.

1.1.1 Stammzellplastizität

Zahlreiche Untersuchungen wiesen auf die Fähigkeit adulter Stammzellen zur Ausreifung in verschiedene Zelltypen hin, was die anschließende Analyse der Expression spezifischer Markerproteine bestätigte. Die Potenz zur Differenzierung in Gewebe endodermalen, mesodermalen wie auch ektodermalen Ursprungs wird als Stammzellplastizität bezeichnet⁴, die gewebefremden Differenzierung wird Transdifferenzierung genannt. Osteoblasten werden der mesenchymalen Differenzierungsreihe zugeordnet. Nach Transfusion wurden genmarkierte Knochenmarkzellen im Tiermodell allerdings sowohl als funktionell intakte Osteoblasten spenderursprungs, als auch als hämatopoetische Zellen im Knochenmark gefunden. Auch auf DNA-Ebene gab es Hinweise auf eine gemeinsame Vorläuferzelle von hämatopoetischen Zellen und Osteoblasten⁵. Andererseits konnte gezeigt werden, dass neuronale Zellen, die in letal bestrahlte Empfängermäuse injiziert wurden, hämatopoetische Zellen bilden konnten⁶. Sie trugen den auf allen hämatopoetischen Zellen vorhandenen Oberflächenmarker CD90. *In vitro* ist die Plastizität der MSC mit der Zugabe von Differenzierungsfaktoren nachzuvollziehen. MSC konnten in klassisch mesenchymale Gewebe Adipozyten, Osteozyten, Chondrozyten, differenziert werden⁷, aber auch in Stromazellen, Herz- und Skelettmuskelzellen⁸. In Bezug auf die Neurogenese sprechen einige Autoren von „neuronenähnlichen“ Zellen, auch wenn diese funktionelle Merkmale von Neuronen aufwiesen⁹. Nach Entzug der zugegebenen Wachstumsfaktoren entdifferenzierten sich MSC wieder und nahmen ihre typisch spindelförmige Gestalt an¹⁰. Selbst nach Differenzierung geht ihnen die Fähigkeit, alternative Phänotypen anzunehmen, etwa Osteoblasten und Adipozyten, nicht verloren, wie *in vitro* gezeigt werden konnte¹¹.

1.1.2 Immunphänotypisierung

Die immunphänotypische Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen erfolgt anhand einer Reihe von Oberflächenmolekülen. Da für MSC kein spezifischer Marker existiert, wird eine Kombination verschiedener Oberflächenmarker zur Charakterisierung benutzt. Die Literaturangaben hierzu variieren, es werden unter anderem die Oberflächenmoleküle CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD106 und CD146 (siehe Abb. 1-3⁷), sowie die Histokompatibilitätsantigene HLA-ABC und HLA-DR angegeben. Die Oberflächenmoleküle CD45, das hämatopoetischen Zellen charakterisiert, und CD34, das hämatopoetischen Progenitoren kennzeichnet, werden als Ausschlussmarker benutzt. Im Gegensatz zu Monozyten sind MSC CD11b- und CD14-negativ. MSC tragen keine HLA Klasse II-Moleküle, die bei Transplantation anderer Körperzellen und Organen eine Abstoßungsreaktion durch T-Zellen hervorrufen. Auch nach osteogener Differenzierung blieb eine

Common name	CD locus	Detection	Common name	CD locus	Detection
Adhesion molecules*			VLA-α2	CD49b	Pos
ALCAM	CD166	Pos	VLA-α3	CD49c	Pos
ICAM-1	CD54	Pos	VLA-α4	CD49d	Neg
ICAM-2	CD102	Pos	VLA-α5	CD49e	Pos
ICAM-3	CD50	Pos	VLA-α6	CD49f	Pos
E-selectin	CD62E	Neg	VLA-β chain	CD29	Pos
L-selectin	CD62L	Pos	β ₂ integrin	CD104	Pos
P-selectin	CD62P	Neg	LFA-1 α chain	CD11a	Neg
LFA-3	CD58	Pos	LFA-1 β chain	CD18	Neg
Cadherin 5	CD144	Neg	Vitronectin R α chain	CD51	Neg
PECAM-1	CD31	Neg	Vitronectin R β chain	CD61	Pos
NCAM	CD56	Pos	CR4 α chain	CD11c	Neg
HCAM	CD44	Pos	Mac1	CD11b	Neg
VCAM	CD106	Pos	Additional markers*		
Hyaluronate receptor	CD44	Pos	T6	CD1a	Neg
Growth factors and cytokine receptors*			CD3 complex	CD3	Neg
IL-1R (α and β)	CD121a,b	Pos	T4, T8	CD4, CD8	Neg
IL-2R	CD25	Neg	Tetraspan	CD9	Pos
IL-3R	CD123	Pos	LPS receptor	CD14	Neg
IL-4R	CD124	Pos	LewisX	CD15	Neg
IL-6R	CD126	Pos	—	CD34	Neg
IL-7R	CD127	Pos	Leukocyte common antigen	CD45	Neg
Interferon γ R	CDw119	Pos	5' terminal nucleotidase	CD73	Pos
TNF-α-1R	CD120a	Pos	B7-1	CD80	Neg
TNF-α-2R	CD120b	Pos	HB-15	CD83	Neg
FGFR		Pos	B7-2	CD86	Neg
PDGFR	CD140a	Pos	Thy-1	CD90	Pos
Transferrin receptor	CD71	Pos	Endoglin	CD105	Pos
Integrins*			MUC18	CD146	Pos
VLA-α1	CD49a	Pos	BST-1	CD157	Pos

Abb. 1-3: Phänotyp humaner MSC (nach Deans RJ und Moseley AB, 2000).

Expression von MHC II-Molekülen aus¹². Es gibt allerdings Berichte darüber, dass MSC immunogen im Mausmodell waren¹³. MSC stellen eine heterogene Zellpopulation mit unterschiedlichem Differenzierungspotential dar. Einer Erklärung zufolge befinden sich Stromazellen innerhalb einer MSC-Kultur in verschiedenen Reifestadien.

1.1.3 Transplantation von mesenchymalen Stromazellen

Das Homing von MSC nach intravenöser Applikation wurde in verschiedenen Maus- und Primaten-Modellen untersucht. MSC konnten zu unterschiedlichen Anteilen in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, hierunter in Lunge, Leber, Herz, Niere, Harnröhre, Gastrointestinaltrakt, Knochenmark, Thymus und Ovar, aber auch in der Haut^{14,15} und neuronalem Gewebe¹⁶. Es bestand bezüglich des totalen Engraftments oder der Verteilung der MSC nach einer bestimmten Zeit kein signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen Applikationsformen, sei es intraossär, intravenös oder intrathekal oder direkt in geschädigtes Gewebe¹⁷. Interessanterweise konnten murine MSC die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in Ratten nach systemischer Infusion verschiedene Gehirnareale besiedeln¹⁸. Hierbei fand sich eine Anreicherung besonders in Arealen im linken ipsilateralen Kortex, die zuvor artifiziell geschädigt wurden. In klinischer Hinsicht konnte eine Reduktion des einhergehenden neurologischen Defizits und eine signifikante Verbesserung der Motorik beobachtet werden. Darüber hinaus präsentierten einige der Zellen neuronalen oder astrozytären Phänotyp, indem sie deren charakteristische Marker NeuN beziehungsweise GFAP exprimierten¹⁸. In ähnlicher Weise reichert sich MSC nach Transfusion in Ratten in verletzten Bereichen des Rückenmarks an¹⁹. Die Migration intravenös verabreichter MSC vor allem an Orte mit Gewebsschädigung spricht unter regenerativen Gesichtspunkten für eine physiologische Zirkulation von MSC.

Erste erfolgreiche Transplantationen von MSC beim Menschen fanden bei Kindern mit Osteogenesis imperfecta (OI) Typ III im Rahmen einer allogener Knochenmarktransplantation statt²⁰. OI ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, hervorgerufen durch eine defekte Kollagen I-Synthese, für die bislang keine heilende Therapie existiert. Kollagen Typ I ist ein essentieller Bestandteil der extrazellulären Matrix des Knochens. Kinder mit OI leiden an wiederholten schmerzhaften Knochenbrüchen, fortschreitender Verformung und vermindertem Wachstum von Wirbelsäule und Extremitäten. Tatsächlich stieg die Zahl der Osteoblasten nach Transplantation allogener MSC. Es konnte ein Chimerismus von Spender- und Empfängerzellen nachgewiesen werden. Außerdem ließen sich ein Anstieg des totalen Körpermineralstoffgehalts und die Bildung von lamellarem Knochen feststellen. Klinisch profitierten die Kinder von der Transplantation, die Anzahl an Knochenbrüchen verringerte sich und die Wachstumsgeschwindigkeit stieg²¹. Ermutigt von den positiven Ergebnissen bei Osteogenesis imperfecta, folgten die ebenfalls erfolgreiche intrauterine Transplantation mit MSC zunächst beim Schaf und schließlich bei einem Feten mit OI²².

1.1.4 Immunologische Eigenschaften

In mehreren Pilotstudien und Einzelheilversuchen profitierten Patienten durch eine Transplantation von MSC während oder nach allogener Stammzelltherapie von einem immunmodulierenden Effekt. *In vitro* inhibierten MSC die Proliferation allogener T-Zellen. Durch Co-Transplantation mesenchymaler Stromazellen ließ sich das Risiko einer akuten GvHD signifikant senken^{23,24}, während es bei Patienten mit voll entwickelter GvHD in den ersten Wochen nach anschließender allogener MSC-Transfusion zur Rekonvaleszenz kam. In Stockholm konnte 2004 ein Patient mit akuter lymphatischer Leukämie erfolgreich mit haploidentischen MSC der Mutter behandelt werden, der nach unverwandter, HLA-kompatibler Stammzelltransplantation eine viertgradige, therapieresistente GvHD entwickelt hatte²⁵. Allerdings scheint das aggressive KMT-Regime das Engraften der MSC schwerwiegend zu beeinträchtigen, so dass mindestens 10^6 MSC pro Kilogramm Körpergewicht benötigt werden²⁶.

Die Immunantwort des Empfängers ist aufgrund der geringen HLA I-Moleküldichte auf MSC gering, in keinem Fall wurden Reaktionen ähnlich einer GvHD oder Serumkrankheit beobachtet³.

1.2 Zellexpansion *in vitro* unter "GMP"-konformen Bedingungen

1.2.1 MSC-Gewinnung

Verschiedene Verfahren stehen zur Verfügung, um MSC aus Knochenmark zu isolieren. Die Isolation aus anderen Geweben soll hier nicht berücksichtigt werden. Hauptsächlich können zwei Verfahren unterschieden werden. Anhand einer Kombination von Oberflächenmarkern können MSC einerseits FACS-basiert selektioniert oder in der Zellkultur durch ihre Eigenschaft, an Plastik zu adhären angereichert werden. Durchflusszytometrisch gereinigte MSC sind verfahrensgemäß homogener, die Prozedur ist aufwendig und mit hohen Kosten verbunden. Unklar ist, ob die Einschränkung durch das gewählte Marker-Set eine Einschränkung des späteren Differenzierungspotentials bedeutet. Die Selektion nach Adhärenz ist ein einfaches Verfahren, mit dem Stromazellen von hämatopoetischen Zellen getrennt werden können. Um die Kultur nicht mit unerwünschten Zellen zu belasten, werden alle suspendierten Zellbestandteile und Erythrozyten entfernt. Dies kann durch Isolation der mononukleären Zellen in der Dichtegradientenzentrifugation oder durch die weniger zytotoxische Lyse der Erythrozyten mit einem Ammoniumchlorid-Puffer geschehen²⁷.

1.2.2 FCS-freie Kultur

Die Proliferationsrate von MSC ist stark abhängig vom verwendeten Kulturmedium. Da die klinische Anwendung die schnelle Expansion der Zellen voraussetzt, waren an die Entwicklung eines optimierten Kulturmediums zwei Anforderungen gestellt: es sollte eine hohe Proliferationsgeschwindigkeit gewährleisten und GMP-konform gleichzeitig frei von tierischen Bestandteilen sein, um das Risiko von Erregerübertragung und Immunreaktionen zu minimieren.

Zu den mitogenen Faktoren gehören PDGF (*platelet-derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und IGF (*insulin-like growth factor*). PDGF ist Teil einer Reihe wichtiger intrazellulärer Signalprozesse, etwa der Leukozytenaktivierung, Chemotaxis, der Regeneration der extrazellulären Matrix und der Mitogenese. Der Wachstumsfaktor nimmt eine biologisch bedeutsame Rolle in der Embryogenese und der Gewebsregeneration ein. Beispielsweise wird die ossäre Regeneration durch eine Entzündungsreaktion im gut vaskularisierten Gewebe in Gang gesetzt, bei der Thrombozyten aktiviert werden und Osteoblasten-Progenitorzellen, mesenchymale Vorläuferstammzellen, angelockt werden. Über die genaue Interaktion von aktivierten Thrombozyten, die durch Degranulation PDGF ausschütten, und MSC ist noch wenig bekannt, doch können auch *in vitro* MSC in mit Thrombozyten angereichertem Kulturmedium zur Proliferation angeregt werden. Eine hohe Calciumkonzentration fördert die osteogene Differenzierung, im Gegensatz zu Thrombin als Degranulationsstimulans. Dass PDGF ein wesentlicher Wachstumsfaktor für MSC in der mit Thrombozyten angereicherten Kultur ist, zeigt der signifikante Rückgang der Proliferationsrate bei Zugabe von PDGF-Antikörpern²⁸.

1.2.3 Mausmodell

Da die Beobachtung des Homings nach Transplantation mesenchymaler Stammzellen am Menschen äußerst schwierig ist, wurden verschiedene allogene und xenogene Tiermodelle entwickelt. Xenotransplantationen rufen in gesunden, immunkompetenten Vertebraten normalerweise eine starke Abstoßungsreaktion hervor, weswegen die Tiere zuvor entweder subletal bestrahlt werden oder eine starke Immundefizienz aufweisen müssen. Immundefiziente Mausmodelle wurden ursprünglich als Modelle zur Analyse von immunregulatorischen Prozessen und zur Untersuchung der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen verwendet. Die ersten immundefizienten Mäuse waren thymusaplastische Nacktmäuse (*nude mice*), denen reife funktionelle T-Lymphozyten fehlen²⁹. Mittlerweile sind weitere immundefiziente Mausstämme etabliert, wie z.B. SCID, RAG oder SCID-NOD Mäuse. SCID steht für *severe combined immunodeficiency* (schwere kombinierte Immundefizienz), was bedeutet, dass SCID-Mäuse durch den Mangel an dem Enzym Adenosin-deaminase keine peripheren T- und B-Zellen entwickeln können³⁰. Auch wenn zum aktuellen Zeitpunkt bekannt ist, dass MSC keine Immunreaktionen hervorrufen, da ihnen MHC I -Oberflächenmoleküle weitgehend fehlen, wurden in der vorliegenden Arbeit NOD/LtSz-Rag-defizienten Mäuse eingesetzt. NOD/LtSz-Rag-Mäuse besitzen einen Defekt im *recombination activating gene-1*. Das bedeutet, dass die für das V-Rearrangement verantwortliche Rekombinase RAG-1 fehlt. Dieses Gen ist für die Rekombination der verschiedenen T- und B-Rezeptor-Segmente und somit für deren Expression verantwortlich, letztendlich also für die Entwicklung von funktionellen B- und T-Lymphozyten³¹. NOD/LtSz-Rag^{-/-}-Mäuse sind eine Kreuzung aus RAG und NOD Mäusen, wobei NOD das Akronym für *non obese diabetic* ist. Die Tiere entwickeln durch eine genetische Prädisposition am Genotyp des Haupthistokompatibilitätsantigenkomplex (MHC; *major histocompatibility complex*) auf Chromosom 6p spontan einen insulin-abhängigen Diabetes Typ 1. Die Prädisposition ist an die Gene des MHC's gekoppelt³², so dass durch die veränderten MHC-Moleküle Antigene, die bei der Pathogenese des Diabetes

mellitus eine Rolle spielen, gebunden werden und den Rezeptoren der T-Zellen präsentiert, die für den destruktiven Autoimmunprozess verantwortlich sind. Zusätzlich können die Moleküle des MHC-Komplexes auf antigen-präsentierenden Zellen keine Epitope erkennen. Es findet keine Antigen-präsentation mehr statt und infolgedessen keine Induktion von T-Zellantworten. NOD/Lt-Mäuse weisen eine verminderte Funktion der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie ein Fehlen von zirkulierendem Komplement auf. Als weitere immunsuppressive Maßnahme können die Mäuse zusätzlich mit einer subletalen Dosis bestrahlt werden, um die NK-Zellen zu eliminieren, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Transplantatabstoßung spielen.

1.3 Neurometabolische Krankheiten im Kindesalter

Der Begriff der neurometabolischen Erkrankungen wurde für genetisch bedingte Störungen im enzymatischen Abbau von Intermediaten des Zellstoffwechsels geprägt, die mit schwerwiegenden Folgen für das periphere und zentrale Nervensystem einhergehen. Die Erkrankungen sind gekennzeichnet durch pathologische Lipidansammlungen in den Lysosomen verschiedener Organsysteme. Das Erscheinungsbild ist sehr heterogen. Es sind heute mehr als 35 kongenitale lysosomale Speicherkrankheiten bekannt. Die lysosomalen Speicherkrankheiten werden nach der jeweiligen Speicher-substanz in vier Gruppen eingeteilt: 1. Lipidosen, hierunter die Sphingolipidosen, 2. Mukopolysaccharidosen, 3. Glykoproteinosen, 4. Glykogenosen³³. Der Pathologie liegen Defekte lysosomaler Hydrolasen zugrunde, die für den Abbau der manchmal ebenfalls veränderten Sphingolipide verantwortlich sind, seltener Defekte der Sphingolipidaktivatorproteine. Der jeweilige Enzymdefekt ist in der Regel monogenetisch verankert. Die Funktionsverluste der lysosomalen Enzyme beruhen meist auf Punktmutationen, Deletionen oder Missense-Mutationen. Der resultierende Funktionsverlust der betroffenen Zellen führt schließlich zum Funktionsausfall von Geweben und Organen. Allen lysosomalen Speicherkrankheiten gemeinsam ist der chronisch-progrediente Charakter. Nach anfänglich normaler Entwicklung treten in unterschiedlichem Manifestationsalter überwiegend Veränderungen am zentralen und peripheren

Nervensystem sowie im Knochenstoffwechsel ein, aber auch in anderen Organen wie der Leber, der Milz, dem Herzen oder den Augen. Zu den typischen Charakteristika lysosomaler Speicherkrankheiten gehören: Skelettdysplasien, Dysfunktion des zentralen und peripheren Nervensystems und Vergrößerung viszeraler Organe. Das klinische Erscheinungsbild und der Verlauf sind in Abhängigkeit von dem jeweiligen Enzymdefekt und dem Schweregrad des Funktionsausfalls beziehungsweise der residualen Aktivität des betroffenen Enzyms stark variabel. Häufig verlaufen Erkrankungen mit früher Manifestation fulminanter als bei juveniler oder adulter Manifestation. Aufgrund der Tatsache, dass für viele lysosomale Speicherkrankheiten bisher noch keine Therapie entwickelt werden konnte, sterben viele der Kinder innerhalb der ersten Lebensmonate oder -jahre.

1.3.1 Sphingolipide

Sphingolipide bilden zusammen mit den Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen die Glykokalix der Zellmembran tierischer Zellen. In Varianten sind sie auch bei Pflanzen (Phytosphingosine) und niederen Eukaryonten zu finden. Zentral im Gerüst von Sphingolipiden befindet sich der langkettige Aminodidalkohol Ceramid, welcher sich aus Sphingosin und einer amidisch gebundenen Fettsäure zusammensetzt. Der hydrophobe Schwanz verankert das Sphingolipid in der äußeren Zellmembran. Die freie Hydroxylgruppe kann glykosidisch an einen Kohlehydratrest gekoppelt oder phosphoryliert werden. Es entstehen Sphingoglykolipide und Sphingophospholipide. Zu den Sphingoglykolipide gehören die neutralen Cerebroside, die mit einem Monosaccharid verknüpft sind. Ein Beispiel für ein Sphingophospholipid ist das Sphingomyelin. Sphingomyelin entsteht entweder unter CMP-Abspaltung aus CDP-Cholin und N-Acetylsphingosin oder aus Phosphatidylcholin und Ceramid. Bei Defekt des abbauenden Enzyms Sphingomyelinase kommt es zum Symptombild des M. Niemann-Pick A und B. Sphingoglykolipide lassen sich weiter aufteilen in

- Cerebroside
- Sulfatide
- Globoside
- Ganglioside

Cerebroside sind im Gehirn hauptsächlich an *D*-Galaktose, in parenchymatösen Organen an *D*-Glukose gekoppelt. Analog entwickelt sich bei gestörtem Abbau von Galaktocerebroside der Symptomenkomplex des M. Krabbe, im Fall von Glukocerebroside der M. Gaucher und im Fall von Galaktocerebroside-3-Sulfat die Metachromatische Leukodystrophie (MLD).

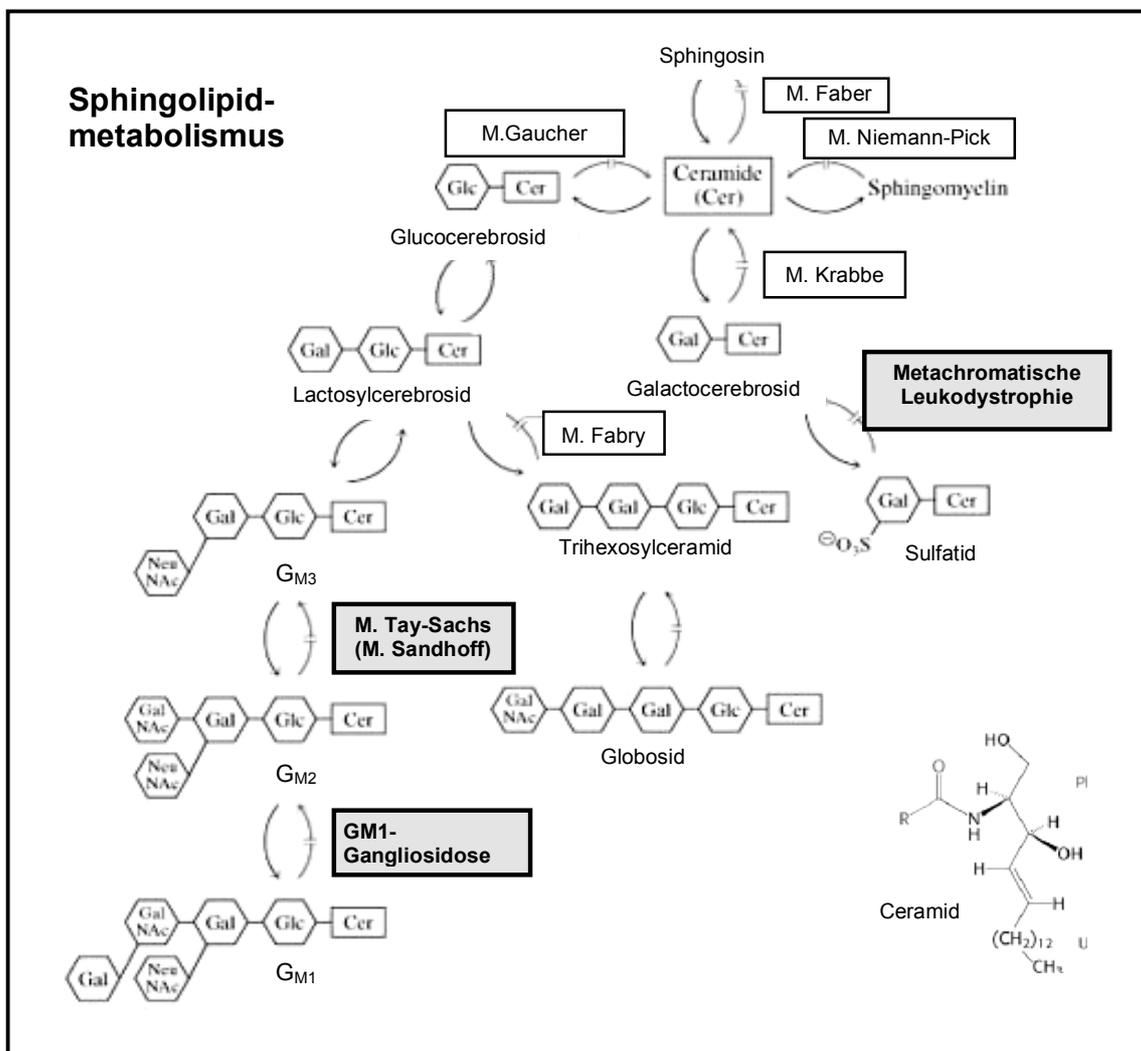


Abb. 1-4: Übersicht über die bekanntesten Spingolipidosen und ihre hauptsächlich akkumulierten Stoffwechselprodukte (aus: Horton et al., Principles of Biochemistry).

Negativ geladene Ganglioside befinden sich überwiegend im Nervensystem. Im Gegensatz zu den einfachen Cerebrosiden enthalten sie bis zu sieben Zuckerreste, die als verzweigte Ketten in den Interzellularspalt ragen. Die saure Valenz erhalten sie durch ein oder mehrere Sialinsäurereste (N-Acetylneuraminsäure) an der Kohlehydratkette, durch die sie die Eigenschaften der Zelloberfläche mitbestimmen. Der Gesamtfettgehalt des Menschen setzt sich zu einem Viertel aus Gangliosiden zusammen, wobei die graue Substanz den höchsten Gangliosidgehalt besitzt. Werden Ganglioside in Neuronen übermäßig angereichert, schwellen die proximalen Axone zu sogenannten Meganeuriten an, in denen Kern und Nissl-Schollen in die Peripherie verschoben werden. Die Interaktion von Gangliosiden mit Calciumionen stellt vermutlich ein elektrostatisches Feld her, das die Rezeptor-Ligand-Bindung bei der Adhäsion verstärkt.

1.3.2 Lysosomen

Die eukaryote Zelle ist in Kompartimente mit unterschiedlichen Funktionen gegliedert. Im lysosomalen Kompartiment werden extrazelluläre, endozytierte Makromoleküle (Proteine, Lipide, Nukleinsäuren und Saccharide) und phagozytierte Pathogene degradiert. Auf Phagozytose spezialisierte Zellen wie Makrophagen bilden spezielle Phagolysosomen aus. Eine weitere Aufgabe der Lysosomen ist es, intrazelluläre zytosolische Makromoleküle und Organellen abzubauen. Dieser Vorgang wird als Autophagie bezeichnet. Degradierete Zellbestandteile und Teile phagozytierter Moleküle werden unter anderem durch MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche CD4⁺-Zellen präsentiert, deren Immuntoleranz wie auch deren Immunantwort hierdurch modifiziert wird³⁴. Zur Degradation der unterschiedlichen Substrate sind im lysosomalen Kompartiment circa 40 Hydrolasen lokalisiert. Dabei handelt es sich um Glykoproteine, die als inaktive Vorstufen am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und mittels N-terminaler Signalsequenzen in das rER-Lumen transferiert werden. Die Glykosylierung lysosomaler Proteine und sekretorischer Proteine erfolgt kotranslational im rER sowie posttranslational im Golgi-Apparat. Im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) erfahren die lysosomalen Glykoproteine eine

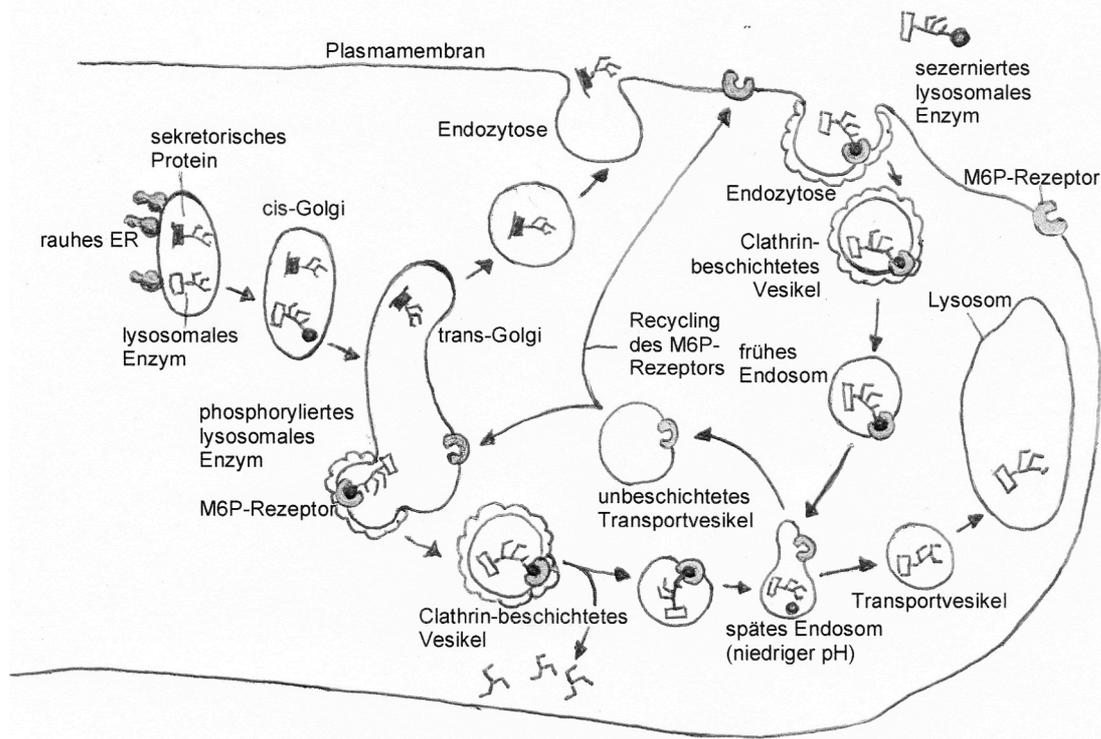


Abb. 1-5: Sortierung sekretorischer und lysosomaler Proteine (nach Lodish et. al, 2000, Molecular cell biology).

Sortierung³⁵. Während sekretorische Glykoproteine über Transportvesikel sezerniert werden, werden lösliche lysosomale Glykoproteine aufgrund besonderer Erkennungssignale in die Lysosomen sortiert (Abb. 1-5). Als Erkennungssignal dienen posttranslational an den Oligosacchariden der lysosomalen Glykoproteine synthetisierte Mannose-6-Phosphate. Diese werden von membranständigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren im TGN erkannt, gebunden und die lysosomalen Enzyme über *clathrin coated vesicles* (mit Clathrin ausgekleidete Vesikel) in die Endosomen sortiert³⁶. In den Endosomen treffen zum Abbau bestimmte Makromoleküle mit den lysosomalen Enzymen zusammen. Die Prozessierung inaktiver Vorstufen lysosomaler Enzyme beginnt bereits im prälysosomalen, endosomalen Kompartiment. Die lysosomalen Proteine dissoziieren in den Endosomen von den Mannose-Phosphat-Rezeptoren und gelangen danach in die Lysosomen. Dort wird die Prozessierung durch limitierte Proteolyse der lysosomalen Enzyme bei einem sauren pH-Wert zwischen 4,5 und 5 abgeschlossen. Aus den lysosomalen Proenzymen werden so reife lysosomale Enzyme. Für die β -Hexosaminidase

und die α -Mannosidase konnte gezeigt werden, dass schon die Proformen katalytisch aktiv sind³⁷. Bei den lysosomalen Hydrolasen handelt es sich hauptsächlich um Proteasen, Sulfatasen, Glykosidasen, Nukleasen und Lipasen, deren Aktivitätsoptimum bei einem pH von 4,5 bis 5 liegt. Der saure pH-Wert in den Lysosomen wird durch Protonenpumpen aufrechterhalten, die zu den vakuolären ATP-asen (V-Typ) gehören. Die Synthese lysosomaler Enzyme in Form von katalytisch inaktiven Proenzymen, die relativ späte Aktivierung und die zusätzliche Aktivitätseinschränkung auf einen sauren pH-Bereich, dienen zum Schutz zellulärer und auch extrazellulärer Proteine vor Verdauung durch Proteasen. Die vorzeitige Degradation lysosomaler Enzyme wird durch ihren hohen Glykosylierungsgrad verhindert. Weiterhin ist die Innenseite der Lysosomenmembran durch hochgradig glykosylierte integrale Membranproteine wie Lamps (*lysosomal associated membrane proteins*) und Limps (*lysosomal integral membrane proteins*) vor dem Abbau durch saure Hydrolasen geschützt³⁸. Bei Defekten der lysosomalen Hydrolysen oder der betreffenden Aktivatorproteine werden Zellmetaboliten nicht oder in vermindertem Maß abgebaut und reichern sich in den zu Speichergranula entartenden Lysosomen an. Durch die haltlose Anhäufung kommt es allmählich zur Funktionsstörung bis hin zum Untergang der Zelle und des betroffenen Organsystems. Die gespeicherten Sphingolipide sind ähnlich wie bei den GM₂-Gangliosidosen als fein granuliertes Material im Zytoplasma von peripheren und zentralen Neuronen sowie Glia- und Astrogliazellen zu erkennen. Elektronenmikroskopisch sieht man konzentrisch geschichtete, membranöse Einschlusskörperchen (*membranous cytoplasmatic bodies*, MCBs, s. Abb. 1-6³⁹).

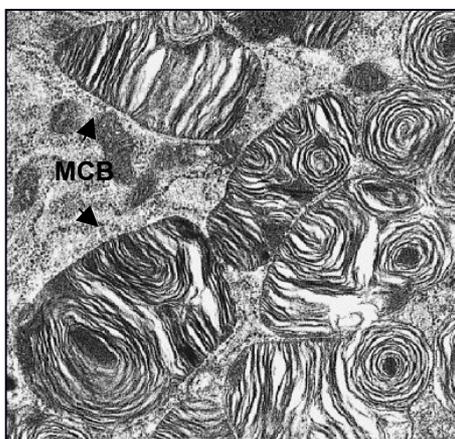


Abb.1-6: Elektronenmikroskopische Darstellung von glykolipid-gefüllten Liposomen (*membranous cytoplasmatic bodies*, MCBs) (in: Biochem. J.(1996) 315, 369-375).

1.3.3 Erkrankungen durch gestörten lysosomalen Sphingolipidabbau

Sphingolipidosen können, neben der biochemischen Einteilung, klinisch nach vorherrschender Symptomatik in Erkrankungen mit viszeraler Beteiligung (z.B. Hepatosplenomegalie: M. Niemann-Pick A und B, M. Gaucher), mit zentraler und peripherer Demyelinisierung (Metachromatische Leukodystrophie, M. Krabbe) und Erkrankungen mit vorwiegend neuronaler Speicherung (Gangliosidosen) gruppiert werden. Als eigene Krankheitsentitäten lassen sich der M. Faber, M. Fabry und M. Niemann-Pick C und D beschreiben. Abbildung 1-7 zeigt Hauptmerkmale und Verlauf der genannten Lipidspeicherkrankheiten.

Einige der Sphingolipidosen zeigen unterschiedliche klinische Verläufe. Eine Restaktivität des betreffenden Enzyms verlangsamt die Progredienz der Erkrankung und mildert die Symptomatik, so dass der Krankheitsbeginn bis in das Erwachsenenalter hinausgeschoben sein kann⁴⁰. Erkrankte erreichen auch bei protrahiertem Verlauf selten eine normale Lebenserwartung. Der Tod tritt meist durch wiederholte Aspiration bei bulbärer Degeneration mit nachfolgender Pneumonie oder anderen Infektionen ein. Radiologisch zeigen Patienten mit Lipidspeicherkrankheiten mit zentralnervöser Symptomatik ein Bild ähnlich der altersbedingten Degeneration der weißen Substanz⁴¹. Ein ausgeprägter

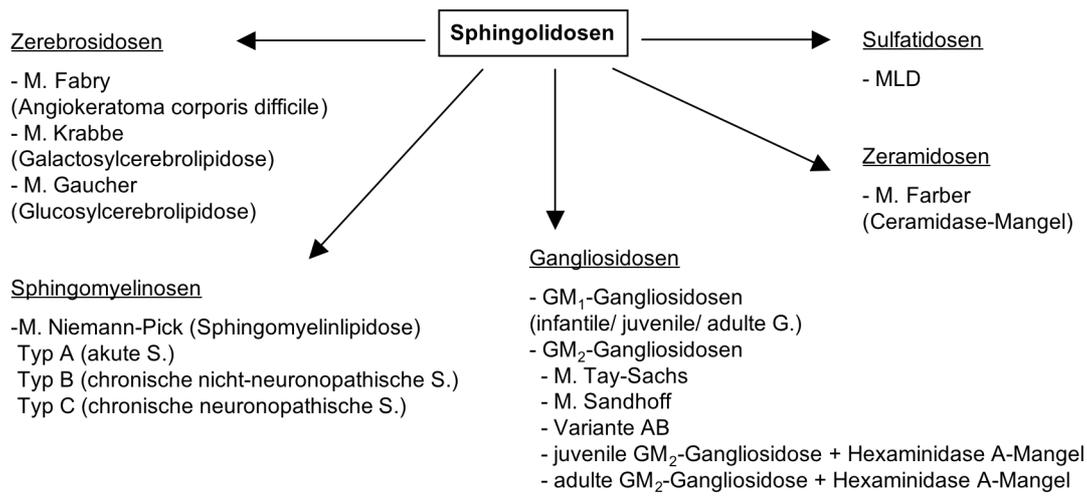


Abb. 1-7: Einteilung der Sphingolipidosen nach Intermediärmetaboliten (aus: Mehnert H. Stoffwechselerkrankungen, 2. Auflage, Thieme Verlag).

Hydrocephalus internus weist auf eine Atrophie der Groß- und Kleinhirnrinde sowie periventrikulär hin. Der Vererbungsweg ist fast ausschließlich autosomal-rezessiv, nur M. Hunter und M. Fabry werden X-chromosomal-rezessiv vererbt.

Näher eingegangen werden soll an dieser Stelle auf vier der neuro-metabolischen Erkrankungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für enzymatische Untersuchungen herangezogen wurden.

1.3.4 Metachromatische Leukodystrophie (MLD)

Die Bezeichnung Metachromatische Leukodystrophie geht auf die abnormale (braune statt rote) Anfärbung von lysosomalen Speicherprodukten in den Myelinscheiden betroffener Neurone bei der histopathologischen Anfärbung mit Thiazin zurück. Erstmals wurde die Metachromasie 1910 beschrieben⁴². Weiterhin wird eine massive Demyelinisierung im peripheren und zentralen Nervensystem beobachtet. Molekularbiologische Untersuchungen erbrachten, dass aufgrund einer in variablen Maß verringerten Aktivität des hitzelablen Enzyms Arylsulfatase A die Degradation von myelinen Galactosylsulfatiden (Galactocerebroside-3-sulfat, Lactosylsulfatid, Seminolipid und Psychosinsulfat) eingeschränkt bis aufgehoben ist (Abb. 1-8). Zur Hydrolyse der 3-O-Sulfat-

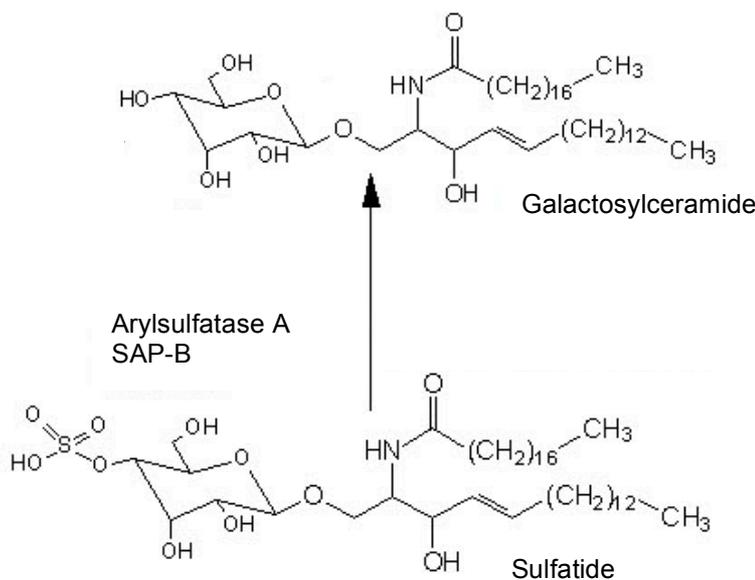


Abb. 1-8: Degradation von Galactosylsulfatiden zu Galactosylceramiden durch Arylsulfatase A und Saposin B (nach M.W. King, themediclbiochemsitrypage.org)

Bindung wird außerdem das hitzestabile Cerebrosid-Sulfatase-Aktivator-Protein Saposin-1 (Saposin B) benötigt, das Sulfatide durch Bildung eines wasserlöslichen Protein-Lipid-Komplex aus der lysosomalen Membran herauslöst, um sie der Exohydrolase zuzuführen⁴³. Ein Defekt von Saposin-1 tritt sehr selten auf und kann durch exogene Zufuhr des gereinigten Enzymaktivators behoben werden. Als Pseudodefizienz wird die herabgesetzte Substratspezifität zur Testsubstanz p-Nitrocatecholsulfat bezeichnet⁴⁴. Sie bringt keine klinischen Symptome hervor, kann aber in chromo- oder fluorogenen Enzymuntersuchungen zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Besteht neben dem Verlust der Arylsulfatase A-Aktivität eine Dysfunktion von Arylsulfatase B, C und vier weiteren Cerebrosid-Sulfatasen wird vom Multiple-Sulfatase-Defekt (MSD) gesprochen⁴⁵. Wegen der zusätzlich eingeschränkten Fähigkeit, Mukopolysaccharide abzubauen, erkranken Betroffene früh und leiden entsprechend den Mukopolysaccharidose-Patienten unter Vergrößerung der Gesichtszüge, Hepato-Splenomegalie und Skelettabnormalitäten⁴⁶.

Die MLD kann sich in jedem Alter manifestieren. Die Inzidenz wird zwischen 1:40000 bis 1:100000 angegeben. Die auslösenden Mutationen sind vorläufig in zwei Gruppen eingeteilt worden. Die eine (O) führt zum vollständigen Fehlen eines aktiven Genprodukts, während die andere (R) einen niedrigen Level funktioneller Enzyme aufweist⁴⁷. Zwei Kopien der Typ O-Mutationen führen zur spätinfantilen Form von MLD. Juvenile Formen werden gewöhnlich mit einer Typ O- und einer Typ R-Mutation in Verbindung gebracht, adulte Formen mit zwei Typ R-Mutationen. Etwa 10% der Bevölkerung sind Träger eines Arylsulfatase A-Gens, das nur 10% der normalen Enzymtätigkeit aufweist. Trifft dies für beide Arylsulfatase A-Genen zu, oder kommt eine Typ O- oder Typ R-Mutation hinzu, liegen die Arylsulfatase A-Werte bei nur 5 bis 10% des normalen Levels. Bezeichnet wird dieser Umstand als Pseudomangel an Arylsulfatase A und kann bei der reinen Bestimmung der Enzymlevel zu einer Fehldiagnose führen⁴⁸.

Eine große Anzahl von Veränderungen des Arylsulfatase A-Gens (ARSA) sind bereits erkannt worden. Es wird davon ausgegangen, dass eine Reihe von Mutationen jedoch noch nicht identifiziert werden konnte. Das macht ein allgemeines DNA-Screening für Träger zurzeit unmöglich. Dagegen ist es möglich, in Familien, in denen die Mutationen bekannt sind, die Träger festzustellen. Dies ist insofern wichtig, als in vielen Familien ein zweites Kind geboren wird, bevor die Erkrankung beim Erstgeborenen diagnostiziert wird. Die klinische Einteilung erfolgt nach dem Alter bei Einsetzen der Symptomatik in eine kongenitale, spät-infantile (Beginn mit 1-2 Jahren), früh- (4-6 Jahre) und spät-juvenile (6-12 Jahre) und adulte (> 12 Jahre) Form⁴⁹.

Typischerweise erlernt ein Kind mit infantiler MLD das Laufen ohne fremde Hilfe verspätet, die schwachen Beine in Valgusstellung. Auffällig sind die abgeschwächten oder fehlenden Muskeleigenreflexe bei positivem Babinsky-Reflex, gepaart mit einer peripheren Neuropathie^{50,51}. Aufgrund einer Radikulopathie leiden die Betroffenen unter sehr starken Schmerzen und schmerzhaften Kontraktionen, die analgetisch behandelt werden müssen. Wenig später fällt das Laufen aufgrund muskulärer Schwäche und Spastizität zunehmend schwerer⁵². Auch geht die Fähigkeit verloren, willentlich Handlungen auszuführen, bis es mit etwa zwei Jahren zur spastischen Quadriplegie mit Harninkontinenz kommt. Die bis dahin entwickelte schwere Demenz des Kindes mündet in ein Stadium vegetativen Daseins. Der Tod tritt zwischen dem dritten und sechsten Lebensjahr ein. Bei späterem Erkrankungsbeginn im Kindes- oder Jugendalter tritt die psychointellektuelle Regression vor dem Abbau sensomotorischer Fähigkeiten zutage. Es überwiegen zu Beginn spinocerebellare (Dysarthrie, Ataxie) und extrapyramidale Symptome (Dystonie, Tremor, Rigor), später dann spastische Paresen. Eine Atrophie des Nervus Optikus wie auch Krampfanfälle können hinzukommen. Bei der adulten Form, die sich zwischen dem 14. und 60. Lebensjahr manifestiert, werden die Betroffenen durch Veränderung der Persönlichkeit, schlechte Leistungen am Arbeitsplatz und emotionale Labilität auffällig. Psychiatrische Erstdiagnosen wie Schizophrenie oder Depression kommen

häufig vor⁵³. Der fortschreitende Verlust der kognitiven und motorischen Funktionen zieht sich in der Regel über ein bis drei Jahrzehnte hin⁵⁴.

1.3.5 GM₁-Gangliosidosen (β -Galaktosidosämie)

Der charakteristische klinische Verlauf der infantilen Galaktosidosämie zeigt einen Säugling mit ödematösem Gesicht und tief sitzenden Ohren, leichter Makroglossie bei hypoplastischer Maxilla und großer Unterlippe, der erst spät die Kopfkontrolle erlangt⁵⁵. Er erlernt gezielte Augenbewegungen und Greifen, meist jedoch unvollständig. Mit etwa sechs Monaten setzt ein Knochenumbau von Brust- und Lendenwirbeln ein, der Schaft langer Röhrenknochen (mehr distal als proximal) und der Metakarpale (vor allem proximal) verbreitert sich, was zur Skoliose und zu breiten Handtellern mit abduzierten Fingern führt⁵⁶. Bei der körperlichen Untersuchung fällt eine Vergrößerung der Leber und Milz auf, EKG-Veränderungen können auf eine endokardiale Fibrose hindeuten. Nach dem ersten Geburtstag verliert das Kind die erlernten Fähigkeiten wieder, Augen- und Handbewegungen werden zunehmend unkoordiniert. Auffällig ist die gesteigerte Schreckreaktion auf hohe Töne, die sich durch Strecken der Extremitäten ausdrückt. Das Kind leidet unter Schluckstörungen und spastischen Lähmungen, die zusammen mit den Skelettdeformitäten die Pflege erschweren. Der Wachstumsverlangsamung und dem Entwicklungsstopp folgt fortschreitende Decerebration, betroffene Kinder sterben meist vor dem zweiten Lebensjahr⁵⁷. Der aggravierte, neonatal einsetzende Typ, bei dem die Kinder nicht selten mit einem lebensbedrohlichen, nicht-immunologisch bedingten Hydrops zur Welt kommen, geht zudem mit einer schweren Kardiomyopathie einher⁵⁸.

Davon abzugrenzen sind die seltenere spätinfantile und die adulte Form, die keine äußerlichen Merkmale hervorbringen⁵⁹. Der Verlust sensomotorischer und psychointellektueller Fähigkeiten beginnt im Kleinkind- und Kindesalter und schreitet mit unterschiedlicher Geschwindigkeit voran. Autistiformes Verhalten bis hin zur schweren Demenz, cerebellare und extrapyramidale Symptome zeugen vom neuronalen Untergang bis zum Tod wenige Jahre nach

Manifestation beziehungsweise im jungen Erwachsenenalter. Besonders Dystonien sind für die GM₁-Gangliosidosen kennzeichnend⁶⁰. Veränderungen des Augenhintergrundes (kirschroter Fleck) sind zur Hälfte bei der infantilen Form, seltener bei späterem Beginn der Erkrankung zu beobachten. Eine Sonderform ist die sehr seltene Morquio B-Krankheit. Sie imponiert milder als die Mukopolysaccharidose M. Morquio A, ist aber ebenfalls durch eine generalisierte schwere Skelettdysplasie mit Minderwuchs, Kyphoskoliose und Flachwirbelbildung, durch viszerale Speicherung und Hornhauttrübung bei fehlender neurologischer Beteiligung gekennzeichnet⁶¹.

Bei allen Formen ist die katalytische Abspaltung terminaler Galaktosereste von GM₁-Gangliosiden (GM₁, Oligosacchariden von GM₁ und Keratansulfat) durch das lysosomale Enzym β -Galaktosidase gestört. Teilweise überschneiden sich deshalb GM₁- und GM₂-Gangliosidosen phänotypisch⁶². Zu einer exzessiven Ausscheidung von Keratansulfat kommt es bei den protrahierten Formen der β -Galaktosidosen und beim M. Morquio B. Verschiedene Mutationen des auf Chromosom 3 gelegenen Gens können Fehler in der korrekten Übersetzung der genetischen Information, im Prozessing der Vorläuferproteine bis hin intralysosomalen Degradation hervorrufen, die dann zur Aktivitätsminderung von β -Galaktosidase führen⁶³. Für die Diagnose der β -Galaktosidase muss ein Defekt eines übergeordneten Glykoproteins ausgeschlossen werden, das sogenannte *protective protein*. Es wirkt stabilisierend auf β -Galaktosidase und aktivierend auf ein weiteres lysosomales Enzym, die Neuraminidase. Ein Defekt des *protective protein* drückt sich in der kombinierten Störung Galaktosialidose aus⁶⁴. Weiterhin wird das Sphingolipid-Aktivatorprotein SAP-1 oder Saposin-B für die Degradation von GM₁ und anderen Gangliosiden benötigt. Die Akkumulation im retikulohistiozytären System (RHS) lässt Zellen in Leber, Milz, Lymphknoten, Thymus, Lunge, Magen-Darm-Trakt, Pankreas und Knochenmark anschwellen. Die Menge an granuliertem Material ist dabei proportional zur enzymatischen Restfunktion und zum Alter bei Einsetzen der Symptomatik, bei spätem Krankheitsbeginn fehlt meist die viszerale Beteiligung. Die Inzidenz liegt in der vergleichbaren australischen anglo-

keltischen Bevölkerung bei etwa 1:400000⁶⁵.

1.3.6 GM₂-Gangliosidosen

Unter dem Begriff GM₂-Gangliosidose werden je nach verbliebenem Enzym vier biochemische Varianten zusammengefasst. Es sind der als Variante B bezeichnete M. Tay-Sachs (Defekt der N-Acetyl-Hexaminidase A (Hex A)), als Variante 0 der M. Sandhoff (Defekt der N-Acetyl-Hexaminidase A und B (Hex A+B)), als Variante AB das Fehlen des GM₂-A-Aktivatorprotein und die Pseudodefizienz Variante B₁, die ohne oder mit nur geringer klinischer Manifestation mit *in vitro* verringerter Substratspezifität für das artifizielle Substrat einhergeht. Ursächlich für die ersten drei Varianten sind Veränderungen in drei Genen. Das HEX A-Gen codiert für die α -Untereinheit, das HEX B-Gen für die β -Untereinheit des $\alpha\beta$ -Heterodimers Hex A und des $\beta\beta$ -Homodimers Hex B. Transkriptionsprodukt des Gens GM2A ist ein Glykoprotein, das analog zu Saposin-1 und -3 zur Extraktion des Gangliosids GM₂ aus der Membran dient⁶⁶. Dieses GM₂-Aktivatorprotein ermöglicht die Bindung an die β -Untereinheit der Hex A, die α -Untereinheit katalysiert dann die terminale Abspaltung von N-Acetylgalaktosamin. Die Hydrolyse von GM₂ findet mit Ausnahme von Erythrozyten in allen Geweben⁶⁷.

M. Tay-Sachs

1881 erstmals in okulärer Manifestation beschrieben, tritt der M. Tay-Sachs mit einer Inzidenz von etwa 1:222000 in der Gesamtbevölkerung selten auf⁴². Die erhöhte Inzidenz bei den osteuropäischen Ashkenazi Juden, mit einer Merkmalsträgerate von 1:27, trug zur genaueren Erforschung der Erkrankung bei. Hochrisikogruppen gibt es zudem unter Franko-Canadiern, Cajuns und Iren. Tatsächlich ist der M. Tay-Sachs eine der ersten genetisch bedingten Erkrankungen, die durch eine Amnioskentese diagnostiziert und die Inzidenz somit in dieser Risikogruppe stark gesenkt werden konnte. Über 90 Mutationen im HEX A-Gen auf Chromosom 15q23→q24 führen zur veränderten Expression der α -Untereinheit. Außer GM₂ werden noch das oligosaccharidreiche Glykopeptid G_{A2} und andere Sphingolipide akkumuliert.

Das klinische Korrelat zur massiven Anreicherung von Gangliosiden in Glia- und Ganglienzellen manifestiert sich der β -Gangliosidose verwandt in einer erhöhten Empfindlichkeit auf schrille Geräusche, geistiger Retardierung und abnehmender motorischer Fertigkeiten in den ersten Lebensmonaten. Die Kinder leiden unter spastischen Paresen und Schluckstörungen. Die Mehrzahl der früh Erkrankten lässt einen kirschroten Fleck im Bereich der Foveola am Augenhintergrund erkennen. Er stellt aufgrund der natürlichen Ganglienzellarmut dieser Region das normale rote Durchschimmern der Choroidea dar, während die Umgebung durch Einlagerung der pathologischen Lipide aufgehellert ist. Der Verlust auditiver und visueller Wahrnehmung ist kortikal bedingt und geht einher mit einer im zweiten Lebensjahr einsetzenden Makrocephalie, gefolgt von schweren Krampfanfällen und Tod durch Aspiration⁶⁸. Bei der juvenilen Manifestationsform erkranken die Kinder später, im Alter von 2 bis 10 Jahren, und sterben mit etwa 10 bis 15 Jahren. Die im angelsächsischen Sprachgebrauch als LOTS (*late-onset Tay-Sachs-disease*) bezeichnete chronische Form der Tay-Sachs-Erkrankung (Beginn variabel im Jugend- und jungen Erwachsenenalter) wird wegen ihrer vorherrschend psychischen Symptomatik (Denkstörungen, Schizophrenie, Depression) und demenziellen Entwicklung oftmals fehldiagnostiziert. Sie geht der Störung cerebellarer Funktionen voraus, mentale und verbale Intelligenz bleiben aber bei spätem Erkrankungsbeginn in der Regel erhalten⁶⁹. Die Degeneration im Bereich der Basalganglien präsentiert sich auch hier hauptsächlich in fortschreitend dystonen Bewegungsmustern. So sind die Betroffenen in der Regel an den Rollstuhl gebunden, können aber in beschützenden Werkstätten arbeiten und ein moderates Alter erreichen.

1.3.7 M. Sandhoff und die GM₂-A-Aktivatorprotein-Defizienz

Im Gegensatz zum M. Tay-Sachs kommen Mutationen des HEX B-Gens auf Chromosom 5q13 betreffend der β -Untereinheit, die Teil beider Hexosaminidasen A + B ist, ubiquitär vor. Die Inzidenz liegt bei etwa 1:422000⁴². Auch die Mutation von GM2A liegt auf Chromosom 5. Die Defizienz von GM₂-A-Aktivatorprotein tritt sehr selten auf und kann durch Zufuhr des gereinigten

Diagnosis	No. of Diagnoses	Median Age (Range)
Tay-Sachs disease	18	1.1 (0.8-50.5)
Sandhoff disease	9	1.0 (0.8-1.9)
GM ₁ gangliosidosis	9	1.2 (0.4-15.2)
Metachromatic leukodystrophy	31	2.3 (0.0-30.0)
Total Lysosomal Storage Disorders	432	2.7 (0-73.2)

Tab. 1-1: Alter bei Diagnosestellung der lysosomalen Speichererkrankungen M. Tay-Sachs, M. Sandhoff, GM₁-Gangliosidose und MLD, (von: Koc et al., 2002)³³.

Glykoproteins behoben werden. Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild der Tay-Sachs'schen und die Sandhoff'schen Erkrankung resultieren aus der Einlagerung unterschiedlicher Speicherprodukte: Bei beiden Subtypen Substrate der Hex A, beim M. Sandhoff zusätzlich Substrate der Hex B, zu denen die Globoside gehören. Der M. Sandhoff wie auch die GM₂-A-Aktivatorprotein-Defizienz sind im neurologischen Phänotyp nicht von der Tay-Sachs-Erkrankung zu unterscheiden. In der schweren infantilen Verlaufsform des M. Sandhoff drückt sich die viszerale Speicherung von Globosiden unter anderem in Form einer Hepatosplenomegalie oder Dysostosis multiplex aus, die beim M. Tay-Sachs fehlt. Auch ist wie bei den GM₁-Gangliosidosen das retikulohistiozytäre System betroffen. Die Ausscheidung abnormaler Oligosaccharide (N-Acetyl-Glukosamin) im Urin, die beim M. Sandhoff stattfindet, nicht aber bei der Tay-Sachs'schen Erkrankung, kann diagnostisch genutzt werden⁷⁰.

1.3.8 Diagnostik lysosomaler Speicherkrankheiten

In der Mehrzahl der Fälle erfolgt die Diagnostik bei Beginn der Symptomatik. Die klinische Untersuchung mit Spiegelung des Augenhintergrunds, die Verringerung der Nervenleitgeschwindigkeit oder die Erhöhung der Liquorproteinkonzentration, können wegweisend zur Diagnose sein. Die häufigste Indikation für spezifische biochemische Tests stellen außer den klinischen Symptomen charakteristische Veränderungen in der Kernspintomographie dar. Bei den leukodystrophieartigen Krankheiten besteht das

Läsionsmuster häufig aus symmetrischen Veränderungen der weißen Substanz. Aufgrund des degenerativen Charakters der Erkrankungen wird die Wiederholung der Bildgebung empfohlen⁷¹. Durch die klinischen Befunde sollte das Spektrum der laborchemischen Untersuchungen eingeengt werden, um Kosten und Aufwand möglichst gering zu halten. Es wird von einem "selektiven Stoffwechsel-Screening" gesprochen. Die Diagnosestellung erfolgt durch Bestimmung der Enzymaktivität im Serum oder Zellkultur von Hautfibroblasten oder Leukozyten (Sulfatidbelastungstest). In den meisten Fällen wird die Enzymaktivität mit synthetischen Substraten gemessen, was aufgrund des Vorhandenseins anderer Sulfatasen eine geringe Hintergrundaktivität belässt. Durch geeignete Wahl der Reaktionstemperatur wird der Fehler so gering wie möglich gehalten. Biopsien des Nervus suralis, der Haut oder der Netzhaut mit den entsprechenden elektronenmikroskopisch sichtbaren Einlagerungen ergänzen die Untersuchungen. Biochemische Methoden verlieren zunehmend zugunsten der Genanalyse an Bedeutung⁷², die bisher nur in begründeten Verdachtsfällen veranlasst wird. Ein allgemeines Neugeborenen-Screening steht noch nicht zur Verfügung. Eine pränatale Diagnostik mittels Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie wird bei Familien mit bereits einem erkrankten Kind, einem erkrankten Kind in deren naher Verwandtschaft oder Bevölkerungsgruppen mit erhöhtem Risiko angewendet.

1.3.9 Therapieoptionen

Die Behandlungsmöglichkeiten für neurometabolische Erkrankungen sind begrenzt. Medikamentöse und physikalische Therapie werden symptomatisch eingesetzt, es stehen vor allem die Behandlung von Infektionen, Schluck- und Atembeschwerden, der Krämpfe, Spastiken und Lähmungen und die Sicherstellung einer ausreichenden Nahrungsversorgung im Vordergrund. Diätetische Maßnahmen haben sich aufgrund der komplexen Stoffwechselwege kaum als wirkungsvoll erwiesen. Auch die Enzyersatztherapie ist problembehaftet und führte nicht zu einem Rückgang der Symptomatik, da lysosomale Enzyme eine kurze Halbwertszeit aufweisen und auch bei Umgehung der Bluthirnschranke durch intrathekale Applikation kein Rückgang der

intrazellulären Speicherung von Gangliosiden nachgewiesen werden konnte⁷³. Experimentelle Studien geben allenfalls die Hoffnung, das Fortschreiten der Krankheit zu verlangsamen. Einige der untersuchten Substanzen zielen auf eine Substratreduktion in den betroffenen Zellen ab und stützen sich auf Erfolge im Tiermodell⁷⁴. In einem anderen Ansatz sollen Chaperone eingesetzt werden, um den defizienten Enzymen ähnliche körpereigene Enzyme durch Umfaltung nutzbar zu machen. Bisher zeigten die klinischen Studien kein positives Ergebnis.

Die *cross correction* von Zellen basiert darauf, dass Mannose-6-Phosphat - markierte Proteine, also auch lysosomale Enzyme, über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor MPR300 auf der Zelloberfläche durch Endozytose aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden und in die Lysosomen gelangen. Defiziente Körperzellen können ihren Stoffwechsel mit Hilfe anderer Zellen korrigieren, wenn diese die Hydrolasen in den Interzellulärspalt sezernieren⁷⁵. In Einzelheilversuchen wurden bei einer Reihe von MLD-Patienten mit juvenilen Verlaufsformen Transplantationen mit hämatopoetischen Stammzellen (HSZT) durchgeführt, wodurch die Erkrankung nach einer Latenzzeit von mehreren Monaten deutlich verlangsamt werden konnte. Auch fanden sich Spenderzellen im Liquor⁷⁶. Risiken und Nutzen der Behandlung müssen besonders bei später Symptommanifestation abgewogen werden. Wegen des bisher limitiert zu beobachtenden Engraftments der MSC nach Transplantation ist der klinische Einsatz von MSC zur Korrektur von metabolischen Erkrankungen zurückhaltend zu bewerten. Auch ist wenig über eine Langzeitpersistenz von MSC bekannt. Nach Transfusion von $2-10 \times 10^6$ MSC/kg Körpergewicht bei fünf Hurler-Patienten und sechs MLD-Patienten, die zuvor eine allogene Knochenmarktransplantation vom gleichen Spender erhalten hatten, konnten keine Hinweise auf eine Besiedlung des Knochenmarks mit Spenderzellen gefunden werden⁷⁷. Im optimalen Fall gewährleistet die kombinierte Transplantation von hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen die Übertragung einer hohen Zellzahl mit nachhaltiger Korrekturwirkung. Die immunmodulierende Wirkung der MSC kann Abstoßungsreaktionen mildern oder gänzlich

verhindern, das Engraften der hämatopoetischen Zellen soll durch Stromasupply verbessert werden²³. Voraussetzung ist zudem ein passender Spender, auch wenn inzwischen die Mortalität auch bei haploidentischer Transplantation gering ist. Große Erwartungen werden bezüglich einer Heilung von lysosomalen Speicherkrankheiten derzeit in die Gen-Therapie gelegt. Mehrmals gelang die Übertragung des fehlenden Gens mittels rekombinierten Retroviren in die defekten hämatopoetischen Stammzellen im Mausmodell bei M. Gaucher⁷⁸. Einer Anwendung der Gen-Therapie stehen jedoch noch nicht abzuschätzende Risiken der Verwendung von Retroviren als Vektoren entgegen, die aus einer potentiellen onkogenen Wirkung erwachsen.

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Bei klinischer Verwendung mesenchymaler Stromazellen sind strenge Anforderungen an Reinheit und Sicherheit vor der Übertragung von Krankheitsauslösern anzustreben. In dieser Arbeit sollten die Bedingungen optimiert werden, unter denen mesenchymale Stromazellen zuverlässig aus dem Knochenmark isoliert, *in vitro* expandiert und zur Transfusion bereit gestellt werden können. Unter Berücksichtigung von GMP-Richtlinien beinhaltet dies die Entwicklung eines tierereiweißfreien Aufzuchtmediums, das die Rahmenbedingungen für eine maximale Expansionsgeschwindigkeit bereitstellt.

Werden die bisherigen Erkenntnisse aus präklinischen und klinischen Studien zusammengefasst, eignen sich mesenchymale Stromazellen nicht nur in der effektiven Therapie von Erkrankungen, die auf Defekten in Geweben mesenchymalen Ursprungs basieren, sondern haben ein breiteres Anwendungsspektrum. Eine Einsatzmöglichkeit liegt in der Entwicklung eines neuen Therapiekonzeptes für neurometabolische Krankheiten. Am Beispiel der Sphingolipidosen Metachromatische Leukodystrophie, Morbus Tay-Sachs, Morbus Sandhoff und β -Galaktosidose sollte ihr enzymatisches Korrekturpotential untersucht werden. Ein Modellversuch sollte das Verteilungsmuster GFP-markierter humaner MSC nach intravenöser Transfusion in NOD-LtSz-Rag^{-/-}-Mäuse aufzeigen. GFP dient hierbei als Reportergen und soll im retroviralen Vektor später durch das Gen des jeweiligen Enzyms ersetzt werden. Als Vorversuch sollte ein effizientes Protokoll zur Transfektion mit GFP erstellt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Abkürzungsverzeichnis

αMEM	<i>α-Minimal essential medium</i>
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BES	N,N-bis[2-hydroxyethyl]2-aminoethanesulfonic acid
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fuorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FFP	<i>Fresh frozen plasma</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GvHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
HBSS	<i>Hank's salt solution</i>
Hex	Hexosaminidase
hMSC	Humane MSC
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
Ig	Immunglobulin
IF	Interferon
M.	Morbus
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i> , multipotente mesenchymale Stromazelle
eGFP	<i>Nuclear green Fluorescent protein</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	Phytoerythrin
PI	Propidiumiodid

RPMI	Medium welches am „Roswell Park Memorial Institute“ entwickelt wurde
SA	Streptavidin
Tab.	Tabelle

3.2 Material

3.2.1 Chemikalien/ Substanzen

Alkohole p.a.	Ethanol, Isopropanol, Methanol, Xylol	Merck, Darmstadt
BES		Sigma-Aldrich, München
Biocoll Separation Solution (Ficoll)	Dichte 1,077 g/ml	Biochrom, Berlin
BSA, Fraktion V	proteasefrei	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid	2,5 M Lösung	Merck, Darmstadt
CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay®		Promega, Madison, WI, USA
Citronensäure		Roth, Karlsruhe
DMSO		Merck, Darmstadt
DMEM	1% Glucose, mit und ohne Phenol Rot	Cambrex, Verviers, Belgien
PBS		Gibco BRL, Paisley, GB
Na-EDTA		Sigma-Aldrich, München
FACS-Flow		Becton Dickinson, Heidelberg
FCS		PAA, Paschin, Österreich
FCS		HyClone, Logan, UT, USA
FCS		Biochrom, Berlin
FFP		Blutspendezentrale Tübingen (Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin)

HBSS	mit und ohne Ca ⁺⁺ -, Mg ⁺⁺ -Zusatz	Gibco BRL, Paisley, GB
Humanes rekombinantes Interferon γ		R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
LB Medium		LAB M, Lancashire, GB
L-Glutamin	200 mM Lösung	Biochrom, Berlin
May-Grünwald-Giemsa- Färbelösung		Merck, Darmstadt
Natriumazid	10% Lösung	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	kristallin	Merck, Darmstadt
Natrium-Heparin	25,000 I.E./ml	Braun, Melsungen
Natriumhydroxid	1 M Lösung	Merck, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	kristallin	Sigma-Aldrich, München
Natrium-Pyruvat	kristallin	Biochrom, Berlin
NovaRED Substrat Kit [®]		Vector Labs, Burlingame, CA, USA
One Shot Max Efficiency-Kit [®]		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Penicillin		Biochrom, Berlin
p-Nitrocatecholsulfat		Sigma-Aldrich, München
p-Nitrophenyl N-Acetyl- β -D-Glucosaminid		Sigma-Aldrich, München
p-Nitrophenyl β -D-Galaktopyranosid		Sigma-Aldrich, München
p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy- γ -D- glucopyranosid		Sigma-Aldrich, München
Propidiumiodid		BD Pharmingen, San Jose, CA
Qiagen Plasmid Midi Kit [®]		Qiagen, Hilden
Quantum 333	1 mM Glutamin	PAA, Pasching, A
RPMI 1640	mit und ohne Phenol Rot	Biochrom, Berlin
SA-FITC Konjugat		Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Salzsäure	1 M Lösung	Merck, Darmstadt
SA-PE Konjugat		Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Stabile Peroxidase Lösung		Merck, Darmstadt

Streptomycin		Biochrom, Berlin
Trypanblau		Biochrom, Berlin
Trypsin 10x	2,5% Lösung	Gibco BRL, Paisley, GB
Trypsin-EDTA	0,05% / 0,02% (w/v)	Biochrom, Berlin
Tween		Roth, Karlsruhe
α -MEM		Biochrom, Berlin
VectaMount Permanent Mounting Medium [®]		Vector Labs, Burlingame, CA, USA

3.2.2 Lösungen, Puffer, Medien

MSC-Präparation

Lysepuffer, auf 1000 ml, sterilfiltriert

8,290 g	Ammoniumchlorid
1,000 g	Kaliumhydrogencarbonat
0,037 g	Na-EDTA x 2H ₂ O
	Aqua bidest.

Medium auf DMEM-Basis (Standardmedium), α MEM- oder RPMI-Basis

	DMEM, α MEM oder RPMI 1640 (1% Glucose)
10% (v/v)	FCS
1 mM	L-Glutamin
100 U/ml	Penicillin
100 μ g/ml	Streptomycin

Für das Standardmedium wurde FCS der Firma Biochrom verwendet.

Medium auf Quantum 333-Basis

	Quantum 333
1 mM	L-Glutamin
100 U/ml	Penicillin
100 μ g/ml	Streptomycin

β-Galaktosidase-Bestimmung

Puffer 1 (pH 4,5)

0,25 M	Natriumacetat
0,5 M	Natriumchlorid
	Essigsäure
	Aqua bidest.

Puffer 2 (pH 4,5)

0,25 M	Natriumacetat
	Essigsäure
	Aqua bidest.

Substratlösung

6 mg	p-Nitrophenyl β-D-Galaktopyranosid
10 ml	Puffer 1

β-Hexosaminidase-A-Bestimmung

Citratpuffer (pH 4,0)

0,1 M	Citronensäure
0,2 M	Natriumpyrophosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)

Substratlösung

100 mg	p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosid
	Aqua bidest.

Gesamt-Hexosaminidase-Bestimmung

Citratpuffer (pH 4,5)

0,1 M	Citronensäure
1 M	Natriumhydroxid

Substratlösung

7 mg	p-Nitrophenyl N-Acetyl-β-D-Glucosaminid
10 ml	Citratpuffer

Arylsulfatase A-Bestimmung

Na-Acetatpuffer (pH 5,0)

1 Teil	0,5 M	Essigsäure
3 Teile	0,5 M	Natriumacetat

Substratlösung

0,01 M	p-Nitrocatecholsulfat
0,005 M	Natriumpyrophosphat
10%	Natriumchlorid
	Natriumacetatpuffer
	Aqua bidest.

Transfektion

Stammlösung 1

1 ml	Calciumchloridlösung ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), 2,5 mM
8,6 ml	Aqua bidest.

Stammlösung 2 (BBS)

50 mM	BES (N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid)
280 mM	Natriumchlorid
1,5 mM	Natriumpyrophosphat
	Aqua bidest.

Qiagen Plasmid Midi Kit Puffer

Buffer P1 (Resuspensionspuffer):

50 mM Tris·Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Buffer P2 (Lysepuffer):

200 mM NaOH, 1% SDS (w/v)

Buffer P3 (Neutralisationspuffer):

3.0 M Kaliumazetat, pH 5.5

Buffer QBT (Equilibrationspuffer):

750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol (v/v); 0.15% TritonX-100 (v/v)

Buffer QC (Waschpuffer):

1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% Isopropanol (v/v)

Buffer QF (Elutionspuffer):

1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% Isopropanol (v/v)

Immunhistochemie

Blockierungslösung A

0,1% BSA
10% Goat Serum
0,4% Triton X 100
PBS

Blockierungslösung B

10 ml Boeringer Blocking Reagent, 10%
10 ml FCS
30 ml Maleinpuffer

Maleinpuffer

100 mM Maleinsäure
150 mM Natriumchlorid
ddH₂O

Blockierungslösung C

0,1% BSA
10% Goat Serum
PBS

Lösung zum Ausschluss der endogenen Peroxidase

0,1% H₂O₂
0,02% Natriumazid
PBS

3.2.3 Antikörper, Lektine, Plasmide

Antikörper -Fluorochrom	Klon	Bezugsquelle
anti-CD34-FITC/ -PE	IgG ₁ , 581 / 563	BD Biosciences, Discovery Labware, Bedford, MA
anti-CD45-APC	IgG _{2a} , UCHL-1	Serotec, Raleigh, NC, USA
anti-CD73-PE	IgG ₁ , monoklonal, AD2	BD Biosciences, Discovery Labware, Bedford, MA
anti-CD90-PE	IgG ₁ , F15-42-1	Serotec, Raleigh, NC, USA
anti-CD105-FITC	IgG _{1K} , monoklonal, N1-3A1	Ancell, Bayport, MN, USA
anti-CD106-FITC	IgG ₁ , 1.G11B1	Serotec, Raleigh, NC, USA
anti-CD146-PE	IgG ₁ , P1H12	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
anti-mouse-IgG ₁ -FITC	MOPC-31C	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti-mouse-IgG ₁ -PE	MOPC-31C	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
rabbit-anti-GFP, HRP-konjugiert	polyklonal	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
goat-anti-rabbit-IgG ₁ -HRP	sc 3837	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
EGFP- Vektor	Plasmid	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

3.2.4 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Einfrierbehälter	Qualilab, über VWR International, Wien
Plattenphotometer (ELISA-Reader) Milenia Kinetic Analyser	Diagnostic Products Corporation, LA, CA, USA
Mikroskop	Leitz Wetzlar, Wetzlar
Neubauerzählkammer	Roth, Karlsruhe

pH-Meter	WTW, Weilheim
Schüttelinkubator	GFL, Burgwedel
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze
Ultrazentrifuge Beckmann L8-70 + Rotor Ti 60	Beckmann, München
Umkehrmikroskop LM Olympus IX50	Olympus, Hamburg
Zellzählgerät COBAS MICROS	Roche Diagnostics, Mannheim
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge für Eppendorf-Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg

3.2.5 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	Corning, Schiphol-Rijk, NL
Eppendorfreaktionsgefäße Safe Lock 0,5; 1,5; 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Rundbodenröhrchen	BD Biosciences, Discovery Labware, Bedford, MA
Falcon Röhrchen 10; 50 ml	BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Objektträger + Deckgläser	Greiner, Frickenhausen
Pasteurpipetten 1-10; 1-20; 10-200; 100-1000 µl	WU, Mainz
Pipettenspitzen 1-10; 10-200; 100-1000 µl	Greiner, Frickenhausen
Transwellkultur-System, 0,8 µm Porengröße	Corning, Schiphol-Rijk, NL
6-Well-Zellkulturplatte	Corning, Schiphol-Rijk, NL
96-Well-Flachbodenplatte	Corning, Schiphol-Rijk, NL
Zellkulturflaschen 25; 75; 162 cm ²	Corning, Schiphol-Rijk, NL

3.2.6 Verwendete Programme

CellQuest	BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA

3.2.7 Zellkultur

Zellen

MSC, Thrombozyten, MLD-Fibroblasten, Mikroglia

Escherichia coli

Die Thrombozyten wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe H. Langer der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen (Bereich III) zur Verfügung gestellt, während die Fibroblasten und Mikroglia vom neurometabolischen Labor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen bezogen werden konnten. Die MSC stammten aus überschüssigem Material von Knochenmarkproben, die zu diagnostischen Zwecken in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Tübingen gewonnen wurden.

Präparate

Die Präparate der hMSC-transplantierten NOD/LtSz-Rag^{-/-}-Mäuse stammten aus dem Labor Handgretinger/Müller des St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA.

3.3 Methoden

3.3.1 Zellbiologische Techniken: MSC

Gewinnung

Unter Einwilligung der Patienten und der Ethikkommission wurde überschüssiges Knochenmark aus zu diagnostischen Zwecken durchgeführten Knochenmarkpunktionen für die Gewinnung von mesenchymalen Stromazellen verwendet. 3 ml Knochenmark wurde zur Erythrozytenlyse unter sterilen Bedingungen mit 10 ml ammoniumchloridhaltigem Lysepuffer versetzt, wobei der Überstand eine himbeerrote Farbe annimmt. Nach Inkubation von 10 bis 20 Minuten wurde das Lysat zweimal mit 30 ml HBSS ohne Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ gewaschen

und abzentrifugiert. Alle Zentrifugationen an MSC-Suspensionen wurden, sofern nicht anders beschrieben, 10 Minuten bei 350 x g und 4°C durchgeführt. Das Knochenmarkpellet wurde in 2 ml Kulturmedium auf DMEM-Basis resuspendiert und auf einem Well einer 6-Lochplatte ausgebracht.

Nach 48 und 72 Stunden wurde der Überstand jeweils in ein neues Well gegeben und durch frisches Medium ersetzt. Nach einer Woche wurden die adhärent wachsenden Kolonien bei 38°C für 10 min mit Trypsin behandelt, um sie von der Plastikoberfläche zu lösen, und in frische Wells umgesetzt, um so anhaftende Osteoblasten aus der Kultur zu entfernen. Anfänglich vorhandene spindelförmige Monozyten verloren sich ebenfalls durch wiederholtes Passagieren der konfluenten, schließlich homogen wirkenden Kultur mesenchymaler Stromazellen.

Kulturbedingungen

Die adhären MSC wurden im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂-Begasung in Kulturmedium auf DMEM-Basis kultiviert, alternativ wurde FCS-freies Quantum 333 verwendet, bei 37°C und 5% CO₂. Das Medium wurde zweimal in der Woche erneuert und nicht auf den Farbumschlag des Indikators Phenol Rot gewartet. Bei dichter Konfluenz wurden die Kulturen gesplittet.

Zellernte

Da die Adhärenz der Zellen zum Teil von divalenten Kationen (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) abhängig ist, wurde vor dem Trypsinieren das Medium gegen HBSS ohne Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ ausgetauscht. Zum Ablösen der MSC wurden 3 ml 2,5%iges Trypsin ohne EDTA-Zusatz, 1:10 verdünnt mit HBSS ohne Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, verwendet, da die Zellintegrität durch das EDTA beeinträchtigt zu werden schien. Der Chelatbildner EDTA bindet normalerweise Calcium- und Magnesium-Ionen, um die Ablösung zu erleichtern. Die Protease Trypsin entfernt Adhäsionsmoleküle (*CAMs: Cell Adhesion Molecules*). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde der Boden der Zellkulturflasche mit 10 ml HBSS gewaschen, um restliche anhaftende Zellen abzulösen. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurde die Zellsuspension mehrmals in der Pipette aufgezogen

und dann in einem Falconröhrchen abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals in 10 ml HBSS gewaschen.

Die Zellzahl wurde per Neubauerzählkammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm² Fläche) ermittelt. Hierbei kann die Zellvitalität mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau evaluiert werden, der nur durch die Plasmamembran geschädigter Zellen ins Zytoplasma diffundieren kann, nicht aber durch die intakte Membran lebendiger Zellen. Eine 162 cm²- Kulturflasche ergibt bei dichtem Bewuchs, der etwa 9000 Zellen pro cm² entspricht, ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen.

Kryokonservierung

Zur späteren Wiederaufzucht wurden die Zellen wie in 3.2.1.3 beschrieben in Suspension genommen und in DMEM mit 40% FCS, 10% DMSO zu 1×10^6 Zellen/ml in Einfrierröhrchen aliquotiert. Mit einem mit zimmertemperiertem Methanol gefüllten Einfrierbehälter sollte eine gleichmäßige Abkühlung mit 1°C pro Minute im –80°C Kühlschranks erreicht werden. Nach einer Woche wurden die Einfrierröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen eines Aliquots erfolgte bei 37°C im Wasserbad bis nur noch ein kleiner Rest Eis darin zu sehen war. Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde dann zügig im späteren Kulturmedium aufgenommen.

3.3.2 Phänotypisierung mittels FACS-Analyse

Prinzip: Fluoreszenz-aktivierte Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorter*, FACS)

Die Durchflusszytometrie kann zum einen dazu verwendet werden, Zellen auf die ihnen immanenten Parameter Größe und Granularität zu untersuchen, zum andern können für bestimmte Zellarten spezifische Oberflächenmarker von Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gebunden und detektiert werden. An dem verwendeten Gerät können bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe in einem Messgang unterschieden werden, so dass Zellen anhand sechs Parameter charakterisiert werden können. Das Durchflusszytometer ist derart konstruiert, dass an einem definierten Punkt eine Quarzküvette von einem Strom einzeln aneinander gereihter Zellen durchflossen wird. Ein Argonlaser

trifft idealerweise an dieser Stelle auf je eine so genannt hydrodynamisch fokussierte Zelle. Zellen streuen das eintreffende Licht entweder mit geringem Winkel ($3-10^\circ$), dem Vorwärtsstreulicht (Forward Angle Light Scatter, FSC), oder in einem Winkel von 90° , dem Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC). Die FSC-Intensität korreliert mit der Größe der Zellen, das SSC lässt Rückschlüsse auf ihre Dichte und Granularität zu. Durch den Argonlaser (488 nm) angeregte Fluorochrome markierter Zellen geben nach Rückfall in ihren Grundzustand Fluoreszenzlicht in Form eines jeweils charakteristischen Emissionsspektrums ab. Durch ein System verschiedener Bandpassfilter, Photoröhren und gegebenenfalls einen zweiten Laser stehen vier Kanäle (FL1-4) zur Verfügung. Auf Diagrammen, die nach Parametern der Fluoreszenzkanäle aufgetragen

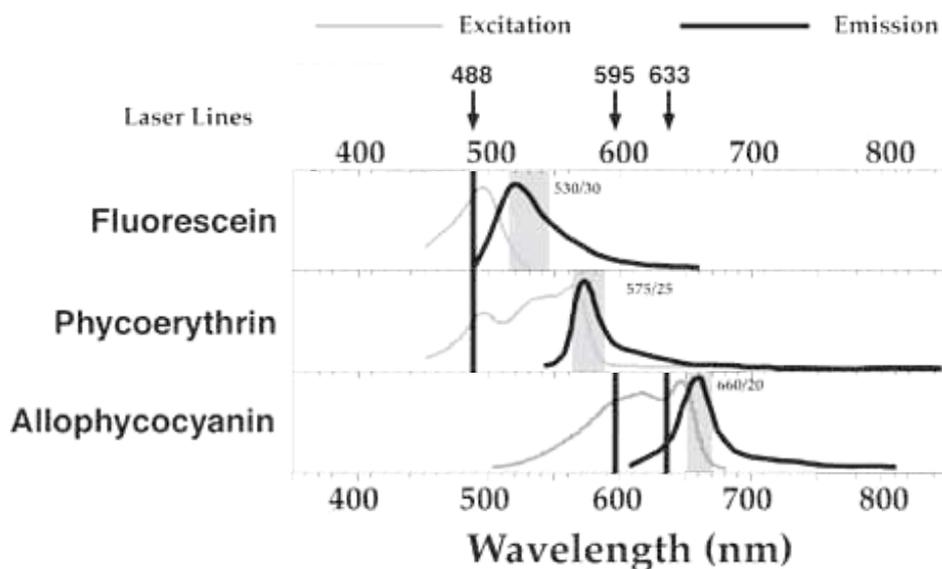


Abb. 3-1: Anregungswellenlänge für die Fluorochrome FITC, PE, APC.

sind, stellen sich auch unmarkierte Zellen aufgrund einer bestimmten Autofluoreszenz dar. Sie basiert auf ihrer chemischen Zusammensetzung. Bei der Einstellung der MSC musste besondere Sorgfalt verwendet werden, da diese eine hohe Autofluoreszenz aufweisen. In diesem Fall stellen sich die Zellen auch ohne vorangehende Markierung als Winkelhalbierende über den negativ definierten Bereich der Fluoreszenzintensität (bis 10^1) hinaus dar. Bei der Kompensation der Fluoreszenzkanäle wurde darauf geachtet, dass die Zellen bei der Messung der Isotypkontrolle innerhalb des negativen Referenzbereichs möglichst weit gestreut sind.

3.3.3 Analyse der Oberflächenmarker

Die MSC wurden auf folgende Oberflächenmarker hin untersucht:

Antigen	Alternativer Name	Ligand	Funktion	Fluorochrom
CD34	Muscosialin	CD62L (L-Selectin)	unklar	FITC
CD45	<i>leukocyte common antigen</i>	-	Tyrosinphosphatase	APC
CD73	-	-	Ecto-5'-Nukleotidase, ermöglicht Nukleosidaufnahme	PE
CD90	Thy -1	-	Regulation der KM- Autoreaktivität?	PE
CD105	Endoglin	TGF- β	Adhäsion, moduliert Zellantworten auf TGF-beta1	FITC
CD106	VCAM -1	VLA-4	Adhäsion	FITC
CD146	MCAM, MUC18, S-ENDO	-	Adhäsion	PE

Tab. 3-1: Untersuchte Oberflächenantigene

Hierzu wurden die Zellen abtrypsiniert, einmal mit HBSS ohne Ca^{++} , Mg^{++} gewaschen und zu 5×10^5 Zellen in 200 μl HBSS je FACS-Röhrchen pipettiert. Von PE-konjugierten Antikörpern wurden je 5 μl , von FITC-konjugierten je 10 μl zugegeben, gevortext, und bei Raumtemperatur im Dunkeln 10 Minuten inkubiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden so gewählt, dass bis zu drei Oberflächenmarker gleichzeitig bestimmt werden konnten. Für die Isotypkontrolle wurde PE- oder FITC-konjugiertes goat-Anti-Mouse-IgG₁ verwendet. Da die Phänotypisierung im Rahmen der Bestimmung der Oberflächen-sialylierung geschah, wurde den Kontrollen außerdem SA-PE (5 μl), bzw. SA-FITC (10 μl) zugegeben. Nach zweimaligem Waschen in HBSS wurden die Zellpellets in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert und mit Hilfe des FACS-Scan analysiert. Die Datenauswertung erfolgte über die CellQuest-Software. Avitale Zellen lassen sich durch kurz vor der Messung zugegebenes Propidiumiodid (1:40) erkennen. Durch elektronisches Gaten werden sie aus der relevanten Zellpopulation herausgerechnet.

3.3.4 MTS-Proliferationsassay

Prinzip: Wirkungsweise des CellTiter 96Aqueous One Solution Cell

Proliferation Assays von Promega

Alternativ zur quantitativen Bestimmung des 5-Bromo-2'-Desoxyuridin(BrdU)-Einbaus in die DNA sich teilender Zellen lässt sich die Zellvitalität mit Hilfe des Tetrazoliumsalses MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-83-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS(a)) bestimmen. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in der Lichtunempfindlichkeit.

In Anwesenheit von PES (Phenazinethosulfat), einem Elektronenbindungsreagenz, wird MTS durch mitochondriale Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen in Formazan umgesetzt, dessen Niederschlag sich im Mikrotiterlesegerät quantitativ bestimmen lässt. PES erhöht hierbei die chemische Stabilität der Lösung. Das gebildete Formazan ist wasserlöslich und kann im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm quantifiziert werden.

Die 96-Lochplatten wurden in Quadrupels wie folgt mit 200 µl Medium versehen:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Medium(Serumquelle) + Zusatz								Medium (Serumquelle) + Zusatz			
DMEM (Biochrom) + 1 mM Pyruvat								DMEM (Biochrom) + 2 mM Gln			
DMEM (Biochrom)								DMEM (Biochrom), keine Zellen			
DMEM (PAA)								DMEM(kein FCS), kein Gln			
Quantum 333 (kein FCS)								αMEM (Biochrom)			
RPMI (Biochrom)								DMEM (Lipumin 10%)			
DMEM (Humanes Serum)								DMEM (Biochrom)			
DMEM (HyClone)								L1 (kein FCS-Supplement)			
DMEM (Biochrom) + 2 mM Pyruvat								DMEM (Biochrom 20%)			

Abb. 3-2: Bestückung der 96-Lochplatte für den Medienvergleich.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
				Medium(Serumquelle), Calciumgehalt							
				DMEM (Biochrom), 2,5 mM Ca ⁺⁺							
DMEM (Biochrom), 1,8 mM Ca ⁺⁺				DMEM (Biochrom), 5 mM Ca ⁺⁺							
				DMEM (Biochrom), 7,5 mM Ca ⁺⁺							
				DMEM (Biochrom), 10 mM Ca ⁺⁺				αMEM(Biochrom), 1,8 mM Ca ⁺⁺			
				αMEM (Biochrom), 10 mM Ca ⁺⁺							
				αMEM (Biochrom), 7,5 mM Ca ⁺⁺				DMEM(Biochrom), 1,8 mM Ca ⁺⁺			
				αMEM (Biochrom), 5 mM Ca ⁺⁺							
				αMEM (Biochrom), 2,5 mM Ca ⁺⁺							

Abb. 3-3: Bestückung der 96-Lochplatte für die Ermittlung der optimalen Calciumkonzentration.

Das zugesetzte FCS wurde von verschiedenen Firmen bezogen, wie in Klammern angegeben. Es wurde nicht hitzeinaktiviert. Für die Gewinnung des humanen Serums wurde Vollblut von gesunden Freiwilligen zu Verfügung gestellt und nach Gerinnung abzentrifugiert. Soweit nicht anders beschrieben wurden allen Medien 10% Serum, 1 mM L-Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Die meisten nicht-konzentrierten Flüssigmedien enthalten Natriumbicarbonat (DMEM) bzw. HEPES. Sie enthalten jedoch wegen der geringen Stabilität in Lösung bei Lagertemperaturen von +2 bis +8°C kein L-Glutamin, keine Antibiotika und kein Serum. Durch Zyklisierung von L-Glutamin bildet sich toxisches Ammoniak. Diesen Medien muss daher L-Glutamin aus einer sterilen Konzentratlösung zugesetzt werden. Die Pyruvatkonzentration wurde in einem Ansatz zusätzlich zu den in DMEM enthaltenen 110 mg/l (1 mM) auf 1 beziehungsweise 2 mM erhöht. Das Kälberserum von PAA sowie HyClone stammt aus BSE-freien Rinderbeständen und ist EMEA-getestet, weshalb es hier im Rahmen der klinischen Fragestellung untersucht werden sollte. Quantum 333 ist ein Fibroblastenmedium, das keinen FCS-Zusatz erforderlich macht, allerdings aufgrund der tierischen Bestandteile nicht klinisch eingesetzt werden kann. L1 ist ein laboreigenes, serumfreies Medium auf RPMI-Basis, das interessehalber mitgetestet wurde. Lipumin ist ein FCS-Ersatz der Firma PAA. Die reguläre

Calciumkonzentration von 1,8 mM (200 mg/l) wurde durch Zugabe von Calciumchloridlösung erhöht. Da es bei hohen Konzentrationen zur Ausfällung des Calciumchlorids kam, wurde der Leerwert von den Messwerten abgezogen.

Für eine 96-Lochplatte wurden MSC einer 165 cm²-Kulturflasche mit 70%igem Bewuchs wurde suspendiert und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in DMEM ohne Zusätze aufgenommen, die Zelldichte auf 9×10^5 Zellen/ml eingestellt und jedes Well mit 40 µl bestückt. Dabei die Zellsuspension wiederholt vortexen, um gleichmäßige Zellzahlen zu gewährleisten. Nach viertägiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ wurde der Überstand zur Messung gegen 100 µl Phenol Rot-freies RPMI ausgetauscht, um die Extinktion nicht zu verfälschen, und mit 20 µl CellTiter 96Aqueous One Solution Reagent (CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay von Promega) 6 Stunden inkubiert. Der Proliferationsassay wurde nach 2, 4 und 6 Stunden im ELISA-Reader bei 490 gegen 630 nm ausgelesen und mit dem Programm Excel ausgewertet (in den Schemata Abb. 3-2 und 3-3 sind die ausgewerteten Wells grau unterlegt).

3.3.5 Zusatz von Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden unmittelbar nach der Isolierung aus heparinisiertem Vollblut unter Vermeidung der Aktivierung bezogen und für die Versuche eingesetzt. Mittels Neubauerzählkammer und Kontrollproben, die im Zellzählgerät des hämatologischen Labors der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen gemessen wurden, wurden verschiedene Thrombozytenkonzentrationen in 10 ml HBSS eingestellt, abzentrifugiert und in der entsprechenden Menge Kulturmedium resuspendiert. Für die Herstellung des Thrombozytenlysats wurden verschiedene Thrombozytenkonzentrationen in 10 ml HBSS eingestellt, abzentrifugiert, resuspendiert und in 1 ml-Eppendorffcups pipettiert. Die Eppendorffcups wurden anschließend bei 40000 x g ultrazentrifugiert und in der entsprechenden Menge Kulturmedium resuspendiert. Gezeigt sind die Ergebnisse für ein Äquivalent zur Konzentration an frischen Thrombozyten von $2 \times 10^5/\mu\text{l}$. Für eine Kombination von humanem Serum und Thrombozytenlysat

wurde DMEM 5% humanes Serum und die Hälfte des Lysatäquivalents beigefügt.

Die 96-Wellplatten wurden wie folgt mit jeweils 200 µl Medium bestückt:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Medium + Zusatz								Medium + Zusatz			
DMEM								DMEM			
DMEM 10% FCS								DMEM 10% FCS			
DMEM 10% humanes Serum								DMEM 10% humanes Serum			
DMEM 5% humanes Serum+ Thrombozytenlysat 50% konzentriert								DMEM 5% humanes Serum+ Thrombozytenlysat 50% konzentriert			
Thrombozytenlysat								Thrombozytenlysat			
Thrombozyten 5x10 ⁴ /µl								Thrombozyten 5x10 ⁴ /µl			
Thrombozyten 2x10 ⁵ /µl								Thrombozyten 2x10 ⁵ /µl			
Thrombozyten 4x10 ⁵ /µl								Thrombozyten 4x10 ⁵ /µl			

Abb. 3-4: Bestückung der 96-Lochplatte für den Zusatz von Thrombozyten als Wachstums-supplement.

3.3.6 Transfektion mit EGFP-Vektor durch Calcium-Phosphat-Präzipitation

Prinzip:

Wird die zu übertragende DNA einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat zugefügt, bindet sie sich an ausfallendes Calciumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Die Parameter dieses Vorgangs, Salzkonzentration und pH der Lösung, Inkubationsdauer, Menge und Reinheit der Plasmid-DNA und andere, können zwischen verschiedenen Zellarten variieren. Diese Methode ist nur für adhärent wachsende Zellen geeignet und bedeutet für die Zellen negativen Stress.

Durchführung:

MSC wurden am Tag vorher in DMEM mit etwa 6000 Zellen/cm² kurz vor dem Konfluieren auf Chamber Slides ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium ausgetauscht und die Transfektion dann folgendermaßen durchgeführt:

Für 2 ml Medium wurde zunächst 4 µl DNA-Suspension (0,7 g DNA/ml in

HBSS) in 96 µl Stammlösung 1 pipettiert und gevortext, dann langsam 100 µl Stammlösung 2 (BBS) eingetropt. Nach 15 Minuten wurde die nun etwas trübe Suspension tropfenweise über den Zellen verteilt. Nach maximal acht Stunden im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium gegen Kulturmedium ausgetauscht.

3.3.7 Vervielfältigung des EGFP-tragenden Plasmids

Die Transformation des EGFP-Plasmids wurde in *Escherichia coli* mit Hilfe des One Shot Max Efficiency-Kit von Invitrogen vorgenommen. 50 µl der Bakteriensuspension wurde mit 1 bzw. 5 µl Plasmidlösung, beide auf Eis, vorsichtig vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Transformationskompetenz zu steigern wurde dann für genau 30 Sekunden auf 42°C erhitzt und die Suspension erneut auf Eis gestellt, bevor 250 µl autoklaviertes SOC Medium damit beimpft wurden. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C auf einem Flachbettschüttler bei 225 rpm, werden 20 µl der Vorkultur auf Agarplatten steril ausgestrichen und invertiert über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten können bei Bedarf zwei Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Prinzip:

Die Plasmidisolierung erfolgte nach der modifizierten alkalischen Lyse-Methode von Birnboim & Doyle mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen). Die Plasmid-Isolierung beruht auf Elution der Plasmid-DNA von einer Silica-Säulenmembran mit einem Puffer.

Durchführung:

Eine Kolonie der plasmidtragenden, wie zuvor beschrieben ausgestrichenen *E. coli*-Bakterien wurde umgesetzt in 250 ml LB Broth Medium (hergestellt nach Anleitung, Kanamycinkonzentration 50 µg/ml) und über Nacht auf einem Flachbettschüttler bei 200 rpm und 37°C expandiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in zwei Zentrifugenflaschen abzentrifugiert bei 6000 x g für 15 min bei 4°C und das Pellet in je 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurde je 4 ml Puffer P2 zugegeben, jede Flasche 6 Mal umgewendet und bei

Raumtemperatur 5 min inkubiert. Das Lysat sollte viskös erscheinen. Beiden Flaschen wurden dann 4 ml gekühlten Puffer P3 gegeben, wieder 6 Mal umwenden und 15 min auf Eis inkubiert. Das Lysat sollte sich auftrennen in klare Flüssigkeit und ein dickflüssiges Präzipitat, welches die DNA enthält. Nach dem Abzentrifugieren bei 17700 x g für 30 min bei 4°C wurde der klare DNA-haltige Überstand sofort erneut abzentrifugiert bei 17700 x g, 15 min, 4°C.

Eluation der DNA:

Währenddessen wurden vier Quiagen-tip100-Säulen äquibriert mit je 4 ml Puffer QBT und der Überstand dann auf die Säulen verteilt. Die Säulen wurden mit je zweimal 10 ml Puffer QC gewaschen und der Überstand verworfen. Die DNA konnte mit je 5 ml Puffer QF eluiert und durch Zugabe von je 7 ml Isopropanol ausgefällt werden. Der Durchlauf von zwei Säulen wurde zusammen bei 15000 x g, 30 min, 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die zurückbleibenden DNA-Pellets wurden nun mit je 4 ml 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert bei 15000 x g, 10 min, 4°C und nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes etwa zwei Stunden lufttrocknen gelassen. In je 1 ml Aqua bidest. ließen sich die DNA Pellets resuspendieren.

3.3.8 Immunhistochemie GFP-transduzierter humaner MSC in paraffinisierten Gewebsschnitten transplantierte NOD/LtSz-Rag^{-/-}-Mäuse

Prinzip:

Alle Dünnschnittschnitte mussten zunächst entparaffinisiert und rehydriert werden. Hierzu wurden sie nacheinander mit Xylol, Ethanol p.a., 90% und 70% Ethanol behandelt und anschließend in HBSS weiter rehydriert. Da einige Gewebe besonders empfindlich gegenüber Xylol sind, musste die Einwirkzeit kurz gehalten werden, aber trotzdem gewährleisten, das Paraffin vollständig zu entfernen. Die Schnitte wurden während des ganzen Vorgangs feucht gehalten, da dies für die Qualität der Färbung entscheidend ist. Als Gegenfärbung (Counterstaining) wurde bei einem Teil der Schnitte eine May-Grünwald-Färbung durchgeführt, um die Zellgrenzen deutlich erscheinen zu lassen. 0,1%

Trypsinlösung sollte die Antigenbindungsstellen demaskieren, danach wurden spezifische Antigenbindungsstellen mit einer Blockierungsreagenz geblockt. Zur Verstärkung des vermutlich schwachen GFP-Signals wurde zusätzlich zu einem rabbit-IgG-anti-GFP-Antikörper ein HRP-konjugierter goat-anti-rabbit-IgG-Antikörper eingesetzt. Die farbliche Darstellung der GFP-markierten Zellen konnte nun mit einem Chromogen in einer Peroxidasereaktion vorgenommen werden. Die endogene Peroxidase wurde zunächst in einem Zwischenschritt durch 30-minütige Inkubation mit Wasserstoffperoxid und Natriumazid geblockt, später aber aufgrund fehlender signifikanter Ergebnisverbesserung und zur Schonung des Gewebes wieder verlassen. Die Fixierung erfolgte nach dem Trocknen in einem Mounting Medium.

Durchführung:

Optimal für die Entparaffinisierung der Schnitte stellte sich heraus: fünf Minuten in Xylol, jeweils zwei Mal fünf Minuten in frischem Ethanol p.a., 90% und 70%, anschließend drei Mal fünf Minuten in HBSS. Anschließend wurde bei einem Teil der Schnitte eine May-Grünwald-Färbung durchgeführt und drei Mal drei Minuten mit HBSS gewaschen. Das Demaskieren der Antigenbindungsstellen erfolgte durch 10-minütige Inkubation in 0,1% Trypsin in Calciumchlorid bei pH 6,6 bis 6,8. Blocken der spezifischen Antigenbindungsstellen in Blockierungslösung B für 30 Minuten. Für die Inkubation mit dem primären Antikörper wurden mit einem wasserfesten Markierungsstift enge Kreise um die Präparate gezogen, um den Antikörperverbrauch gering zu halten. 100-200 µl rabbit-IgG-Antikörper gegen GFP 1:200 in Blockierungslösung A wurden auf die Präparate pipettiert und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Morgen wurden sie in hochkonzentriert salzhaltigem HBSS drei Mal drei Minuten auf der Wippe gewaschen.

Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur mit 100-200 µl goat-IgG-anti-rabbit-Antikörper in Blockierungslösung C. Waschen in hochkonzentriert salzhaltigem HBSS drei Mal drei Minuten auf der Wippe, danach drei Minuten in HBSS ohne Salzzusatz. Das

Anfärben geschah mit dem Nova-Red Kit von Vector Labs nach Anleitung. Die fertigen Präparate wurden getrocknet und mit einem Mounting Medium versehen und unter dem Auflichtmikroskop ausgewertet.

3.3.9 Transwellkultur

Humane MLD-Fibroblasten wurden in einer Dichte von 7500 Zellen/cm² auf dem Boden eines Transwell-Kulturgefäßes ausgesät, MSC in der Dichte von 7500 Zellen/cm² auf der semipermeablen Membran (Porengröße 0,8 µm) des Einsatzes. Die Membran ermöglicht nun den Stoffaustausch in Richtung der Fibroblasten, nicht aber Zellmigration. Als Kulturmedium wurde DMEM mit einem Zusatz von 10% (v/v) FCS, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gewählt, die Dauer der Co-Kultur betrug 6 Tage. Alternativ wurden Fibroblasten zusammen mit Gliazellen kultiviert.

3.3.10 Bestimmung der Enzymaktivitäten im Medium

Prinzip:

Bei diesen Messungen wird ein künstliches Substrat der jeweiligen Enzyme eingesetzt, welches nach Hydrolyse ein Produkt ergibt, dessen Extinktion mittels eines Photometers gemessen werden kann.

Die vier folgenden Enzyme wurden untersucht:

- Gesamt-Hexosaminidase
- Hexosaminidase A
- β-Galaktosidase
- Arylsulfatase A

Durchführung:

Schritt 1: Für alle Enzyme

Die bei -70°C gelagerten Zellpellets sowie die dazugehörigen Überstände wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut. In einem darauf folgenden Schritt wurden die Zellen durch Zugabe von Aqua bidest. auf eine Zellzahlkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und gleichzeitig eine Minute lang

unter Verwendung einer Pipette ohne Schaumbildung lysiert. Zellüberstände wurden unverdünnt angewendet.

Schritt 2: Nur für Arylsulfatase

Aus dieser Zellsuspension mit 1×10^7 Zellen/ml wurden 150 μl entfernt, in ein separates Eppendorfcup gegeben und bei 500 x g und 16°C für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Abnahme des Überstandes und Aufbewahrung in einem Eppendorfcup zur weiteren Verarbeitung.

Gesamt-Hexosaminidase

Ansetzen der Probe:

- 30 μl Zellsuspension (Homogenat)
- 250 μl Gesamt-Hexosaminidase-Substratlösung (p-Nitrophenyl N-Acetyl- β -D-Glucosaminid in Citratpuffer pH 4,5)
- 50 μl Citratpuffer pH 4,5

Der Ansatz wurde gut gemischt und bei 37°C im Wasserbad für 45 Minuten inkubiert. Anschließend Stoppen der Reaktion mit 250 μl 0,5 M NaOH. Nach Überführen der Probe in eine Halb-Mikroküvette erfolgte am Photometer die Extinktionsmessung bei 405 nm gegen Wasser.

Ansetzen des Leerwertes:

- 30 μl Zellsuspension (Homogenat)
- 50 μl Citratpuffer pH 4,5
- 250 μl 0,5 M NaOH

wurden vermischt und bei 37°C im Wasserbad für 45 Minuten inkubiert. Parallel dazu wurden 250 μl Gesamt-Hexosaminidase-Substratlösung im Wasserbad bei 37°C für 45 Minuten getrennt inkubiert. Leerwertansatz und Substratlösung wurden nach der Inkubation vereinigt, in eine Halb-Mikroküvette gegeben und die Extinktion bei 405 nm gegen Wasser am Photometer gemessen.

Ergebnis: Probenansatz – Leerwert

Hexosaminidase A (β -Hexosaminidase A)

Ansetzen der Probe:

- 30 μ l Zellsuspension (Homogenat)
- 75 μ l Hexosaminidase-Substratlösung (p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranoside+Aqua bidest.)
- 225 μ l Puffer pH 4,0

Diese Lösung wurde gut vermischt und bei 37°C im Wasserbad für eine Stunde 40 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 μ l 0,5 M NaOH gestoppt und die Extinktion am Photometer bei 405 nm gegen Wasser gemessen.

Ansetzen des Leerwertes:

- 30 μ l Zellsuspension (Homogenat)
- 225 μ l Puffer pH 4,0
- 250 μ l 0,5 M NaOH

wurden vermischt und bei 37°C im Wasserbad für eine Stunde 40 Minuten inkubiert. Parallel dazu wurden 75 μ l Hexosaminidase-Substratlösung (p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranoside + Aqua bidest.) im Wasserbad bei 37°C für eine Stunde 40 Minuten getrennt inkubiert. Leerwertansatz und Substratlösung wurden nach der Inkubation vereinigt, in eine Halb-Mikroküvette gegeben und die Extinktion bei 405 nm gegen Wasser am Photometer gemessen.

Ergebnis: Probenansatz – Leerwert

 β -Galaktosidase

Ansetzen der Probe:

- 40 μ l Zellsuspension (Homogenat)
- 150 μ l β -Galaktosidase-Substratlösung (p-Nitrophenyl β -D-Galaktopyranoside + Puffer 1)
- 100 μ l Puffer 2 pH 4,5

Nach Mischen des Ansatzes erfolgte die Inkubation im Wasserbad bei 37°C für zwei Stunden. Im Anschluss daran wurde die Reaktion durch Zusetzen von 250 µl 0,5 M NaOH gestoppt. Messen der Probe bei 405 nm gegen Wasser.

Ansetzen des Leerwertes:

40 µl der Zellsuspension (Homogenat)

100 µl Puffer 2 pH 4,5

250 µl 0,5 M NaOH

wurden vermischt und bei 37°C im Wasserbad für zwei Stunden inkubiert. 150 µl β-Galaktosidase-Substratlösung wurden getrennt bei 37°C im Wasserbad für zwei Stunden inkubiert und vor dem Messen mit dem restlichen Leerwertansatz vereinigt. Die Messung erfolgte bei 405 nm gegen Wasser.

Ergebnis: Probenansatz – Leerwert

Arylsulfatase A

Ansetzen der Probe:

50 µl des Zellüberstandes

200 µl Arylsulfatase-Substratlösung (p-Nitrocatecholsulfat)

wurden gut gemischt und anschließend bei 8°C für 48 Stunden inkubiert. Vor der Messung bei 514 nm gegen Wasser erfolgte die Zugabe von 250 µl 0,5 M NaOH zum Stoppen der Reaktion.

Ansetzen des Leerwertes:

50 µl des Zellüberstandes

200 µl Arylsulfatase-Substratlösung (p-Nitrocatecholsulfat)

250 µl 0,5 M NaOH

Der Ansatz wurde vermischt, wie der Probenansatz bei 8°C für 48 Stunden inkubiert und im Anschluss daran bei 514 nm gegen Wasser gemessen.

Ergebnis: Probenansatz – Leerwert

4 ERGEBNISSE

4.1 Schritte zur Optimierung der Kulturbedingungen

4.1.1 Morphologie

Frisch aus Knochenmark isolierte mesenchymale Stromazellen formten in den ersten Tagen der Kultur vereinzelte kleine, adhärente, trianguläre Zellen mittlerer Granularität (Abb. 4-1 und 4-2). Mehrmals konnten einzelne Zellen in der ersten Passage beobachtet werden, die zunächst auf etwa doppelte Größe anwuchsen, bevor sich im Inneren sich mehrere Kompartimente abteilten. Anschließend öffnete sich die „Mutterzelle“ und gab etwa 8 unterdurchschnittlich kleine fibroblastoide Zellen frei, die zu normaler Größe anwuchsen. In den weiteren Passagen nahmen die MSC an Größe um etwa die Hälfte zu. In der Größe waren sie vergleichbar zu den anfangs präsenten Monozyten, die eine Größe von 12 – 25 μm aufweisen. Vereinzelt Zellen breiteten sich aus und nahmen trianguläre bis sternförmige Formen an. Einige der Zellen hatten sehr kleine, circa 0,5 μm große runde Membranpartikel aufgelagert, so dass es den Eindruck erweckte, sie hätten diese abgeschnürt. Die Membranpartikel blieben in Kultur suspendiert, teilten sich nicht und schienen keinen Zellkern zu haben. Infolge von Zellteilung bildeten die MSC Gruppen, bis sie mit zunehmender Konfluenz eine langgezogene spindelige Form annahmen.

Genauere Beobachtungen der MSC ließen morphologische Unterschiede unter dem Einfluss verschiedener Basismedien und auch des Serumzusatzes erkennen. In den Basismedien DMEM, α MEM und Quantum 333 mit den Standardzusätzen veränderten sich die Zellen nicht wesentlich in Größe oder Form (Abb. 4-3 und 4-4). In Quantum 333 formten sich mehr seitliche Ausläufer aus, die ihnen eine eher quadratische oder sternförmige Form verliehen. In RPMI (Abb. 4-7), unter Zusatz von humanem Plasma wie auch Lipumin nahmen sie deutlich an Größe ab. Das Wachstum kam nach wenigen Tagen

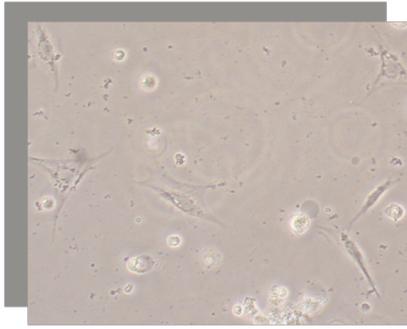


Abb. 4-1: MSC in DMEM 24 Stunden nach Ausplattierung

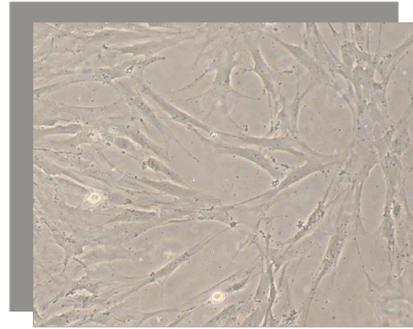


Abb. 4-2: MSC in DMEM 1 Woche nach Ausplattierung

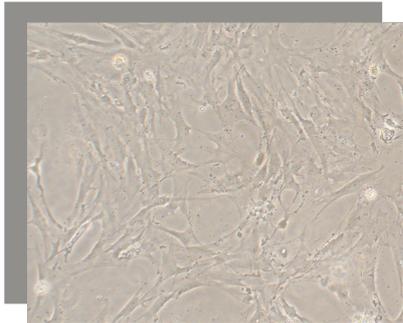


Abb. 4-3: MSC in α MEM

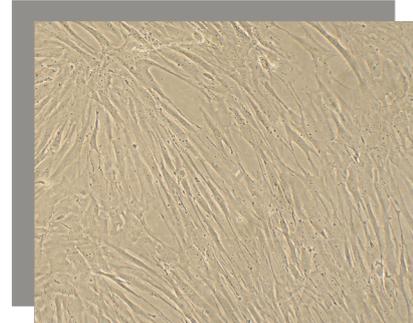


Abb. 4-4: MSC in Quantum 333, konfluierend

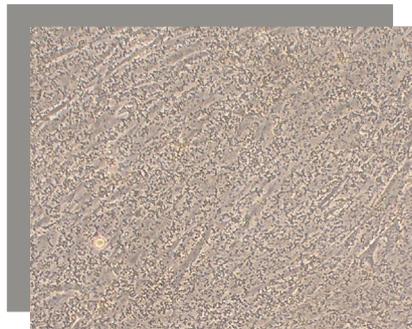


Abb. 4-5: MSC in thrombozytenkomplementiertem Medium

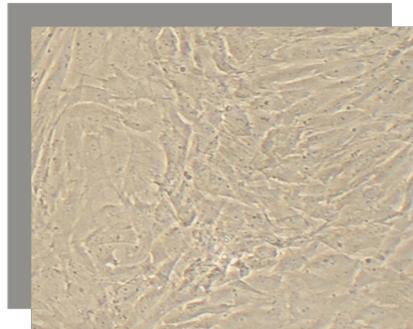


Abb. 4-6: MSC in DMEM mit 10% FFP

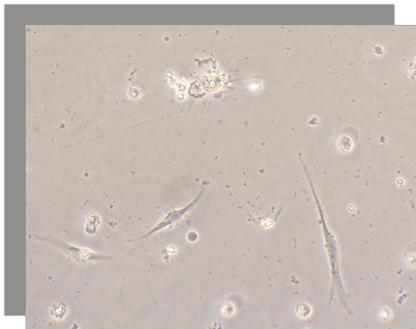


Abb. 4-7: MSC in RPMI, 48h nach letzter Passage

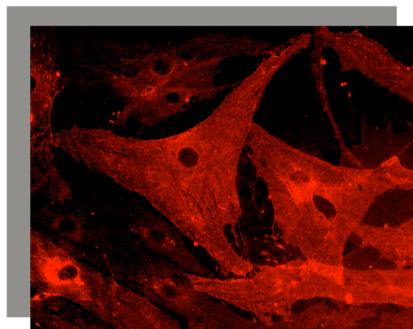


Abb. 4-8: Mesenchymale Stammzellen, Anfärbung mit CD73-PE-Antikörper

zum Stillstand und die Zellen starben. Bei Zusatz von humanem Plasma formten die MSC zudem Kluster und gewannen zunehmend an Granularität. Dünne Fäden organischen Materials spannten sich über dem Zellrasen aus, die nicht oder nur schwer in Trypsin löslich waren. Sie behinderten die Ablösung der MSC beim Splitten der Kultur. Über den Inhalt der Granula ist wenig bekannt. Bei Zusatz von Thrombozyten behielten sie ihre morphologischen Merkmale bis auf eine leichte Zunahme der Granularität bei, bei Zusatz von FFP spannten sich MSC breiter aus (Abb. 4-5 und 4-6).

4.1.2 Phänotypisierung

Die Charakterisierung der wie in 3.2.1 beschrieben gewonnenen mesenchymalen Stromazellen erfolgte mittels Fluoreszenzaktiviertem Durchflusszytometer vor allem anhand der Oberflächenmarker CD45, CD73 und CD105. Ergänzend wurden sie auf die Marker CD34, CD90, CD106 und CD146 untersucht. Abbildung 4-8 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der anti-CD90-PE-markierten Zellen. Die Kombination von CD73 und CD105, erweist sich als besonders geeignet zur Identifizierung der MSC im Knochenmark und der Unterscheidung von den ebenfalls spindelförmigen CD105-positiven, aber CD73-negativen Fibroblasten. Abgrenzend zu den hämatopoetischen Stammzellen lassen sich CD34 und CD45 normalerweise nicht auf der Zelloberfläche von MSC finden. In den folgenden FACS-Färbungen stellten sich MSC geringgradig CD106- und CD146-, und stärker CD73-, CD90- und CD105-positiv dar. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich sofern nicht anders angegeben auf die Zellkultur in DMEM mit geringem Glukosegehalt, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Alle Proben wurden zunächst mittels PI auf ihren Anteil an vitalen Zellen geprüft.

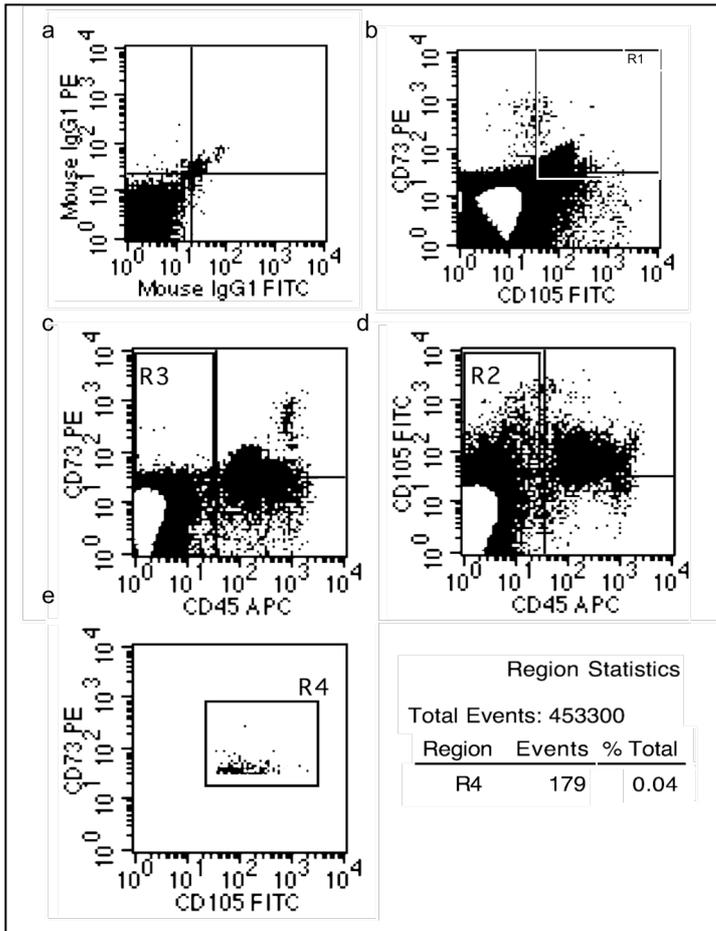


Abb. 4-9: Phänotypisierung von MSC im Knochenmark: nach Ausschluss PI-positiver Zellen (a), Isotypkontrolle mit Anti-Maus-IgG1-FITC und Anti-Maus-IgG1-PE (b), Gaten auf CD73- und 105-positiven Zellen (c), Darstellung von CD73- und CD105-positiven sowie CD45-negativen Zellen (d, e) und Darstellung der Zielzellen (f).

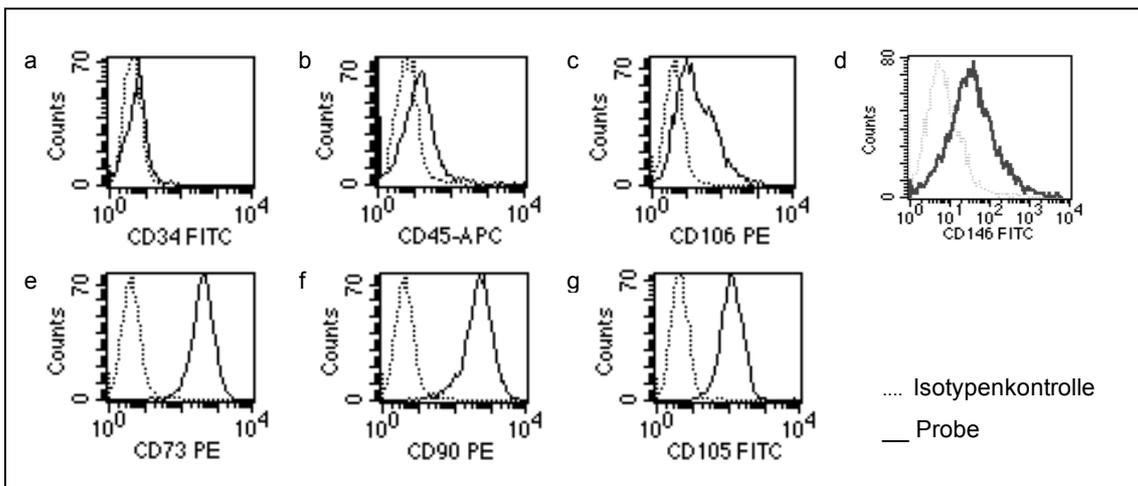


Abb. 4-10 a-g : Histogramme der untersuchten Marker mit Isotypenkontrolle Ig-G1-FITC bzw. Ig-G1-PE. MSC sind deutlich positiv auf CD73, CD90 und CD105, die Kurve von CD106 ist zweigipflig, eine Subpopulation auf die Ursprungszellmenge bezogen jedoch nicht abgrenzen.

4.1.3 Die Identifikation von MSC im Knochenmark

Wie Abb. 4-9 gezeigt ließen sich in Proben diagnostischer Knochenmarkpunktionen nach Erythrozytenlyse 0,04% CD45-negativer, CD73- und CD105-positiver Zellen feststellen. Die Phänotypisierung von *ex vivo* expandierten mesenchymalen Stromazellen. Auch hier wurden alle Proben zunächst mittels PI auf ihren Anteil an vitalen Zellen geprüft. Ein wenig problematisch gestaltete sich die Einstellung der MSC im FACS zum einen durch ihre Größe, zum anderen durch ihre Autofluoreszenz. Trotz optimaler Kompensation der

Fluoreszenzkanäle liegen sie daher nahe der Winkelhalbierenden. Bei der Analyse der Oberflächenmarker zeigte sich über die gesamte Kulturdauer (15 Passagen) hinweg eine starke Präsenz von CD73, CD90 und CD105, während CD106 und CD146 nur schwach, CD34 und CD45 nicht detektiert werden

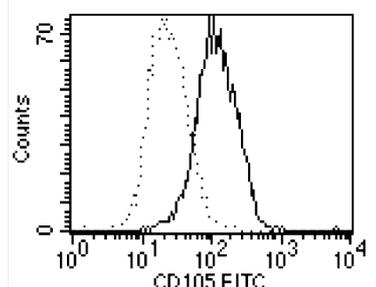
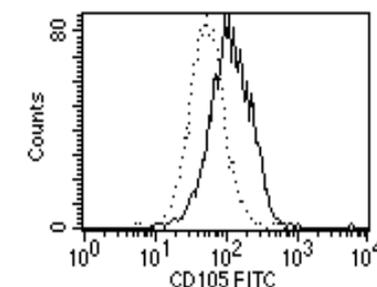
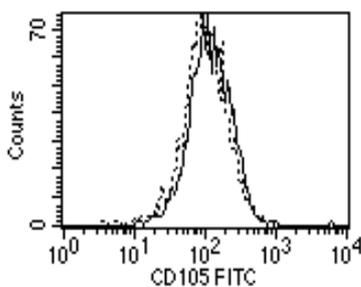
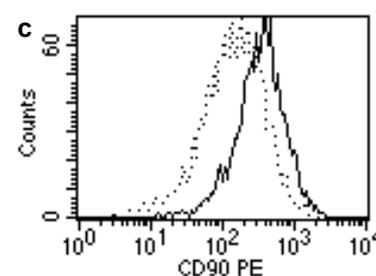
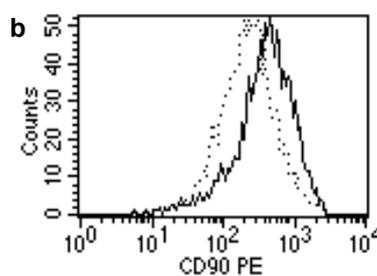
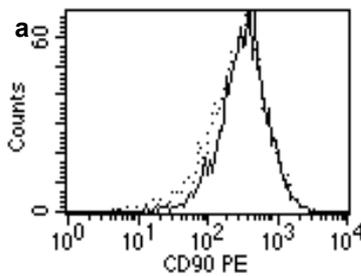
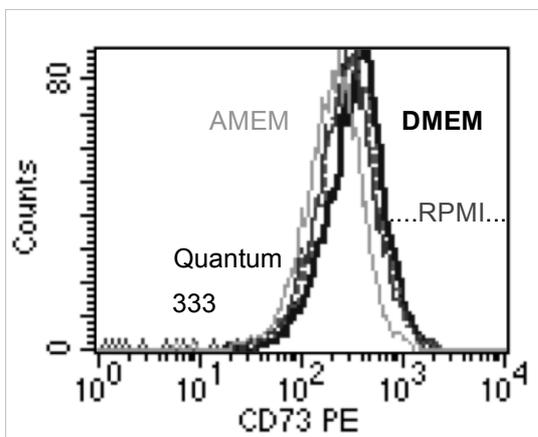


Abb. 4-11: Gezeigt ist hier die Dichte der Oberflächenmoleküle CD73, CD90 und CD105 in Abhängigkeit verschiedener Kulturmedien nach einer Kulturdauer von 6 Wochen. Keines der Medien nimmt Einfluss auf die Expression von CD73, während RPMI vor allem die Expression von CD105 hemmt. Die Medien Quantum 333 (a), AMEM (b) und RPMI (c) (....) sind jeweils im Vergleich zu DMEM (_ _) aufgetragen.

konnte.

4.1.4 Der Einfluss des Kulturmediums auf die Expression der ausgewählten Oberflächenmarker

Die folgenden Untersuchungen zeigten, dass die Inhaltsstoffe des Kulturmedium einen Einfluss auf die Expression von Oberflächenmolekülen haben können und somit nicht nur auf die Charakterisierung und Selektionskriterien bestimmter Zellen wirken, sondern auch deren Eigenschaften verändern können. Abb. 4-11 zeigt MSC nach vier Passagen in verschiedenen Standardkulturmedien. Sie lassen kaum Unterschiede in der Expression von CD73 und CD90 erkennen (Abb. 4-11 a und b), wie auch für CD146 (hier nicht gezeigt). Die Oberflächendichte von CD105, Endoglin, nahm dahingegen um beinahe eine Zehnerpotenz ab, wenn MSC in RPMI kultiviert worden waren. Geringer war der Rückgang in α MEM (Abb. 4-11 c).

4.1.5 Der Einfluss des Kulturmediums auf die Proliferationsgeschwindigkeit

Die Proliferationskinetik in verschiedenen Kulturmedien wurde mit Hilfe von MTS-Assays untersucht. Nach biologischer Umwandlung des als Indikator verwendeten gelben Tetrazoliums Salzes in ein rotbraunes Formazanprodukt ändert sich dessen optische Dichte, die im Elisa-Reader gemessen werden kann. Die Änderung der Extinktion korreliert mit der Stoffwechselaktivität der MSC, und erlaubt damit Rückschlüsse auf ihre Teilungsaktivität. Dies ließ sich mikroskopisch in Korrelation setzen. Sie ist in den Abbildungen 4-12 a bis 4-12 d als prozentuales Verhältnis vom ursprünglichen Standardmedium DMEM mit niedrigem Glukosegehalt, 1 mM Glutamin, 100 I.E./ml Penicillin und 100 μ g Streptomycin aufgetragen. Ein exakter Vergleich der Messwerte war mit dieser Methode nicht möglich, da die gemessene Extinktion außer durch die Metabolisierung des Tetrazoliums Salzes auch zu einem kleinen Teil durch die Dichte des Bewuchs durch MSC bestimmt wurde. Um Fehler bei der Messung durch unregelmäßigen Bewuchs oder unterschiedliche Granulation der MSC in verschiedenen Kulturmedien zu verringern, wurde zur

Auswertung der Leerwert von den Messwerten abgezogen.

4.1.6 Proliferationsrate in Abhängigkeit vom Basismedium

DMEM als Basismedium war sich in Bezug auf eine schnelle Expansion der MSC für den klinischen Einsatz α MEM und RPMI überlegen, dargestellt in Abbildung 4-12 a. Zwar fiel die Proliferationsrate in Quantum 333 um über 25% höher aus, jedoch kann das als Fibroblastenmedium entwickelte Quantum 333 wegen tierischer Bestandteile nicht im klinischen Gebrauch genutzt werden. Während α MEM gegenüber DMEM keine Vorteile bietet, stagniert in RPMI das Wachstum von MSC innerhalb einer Passage beinahe vollständig.

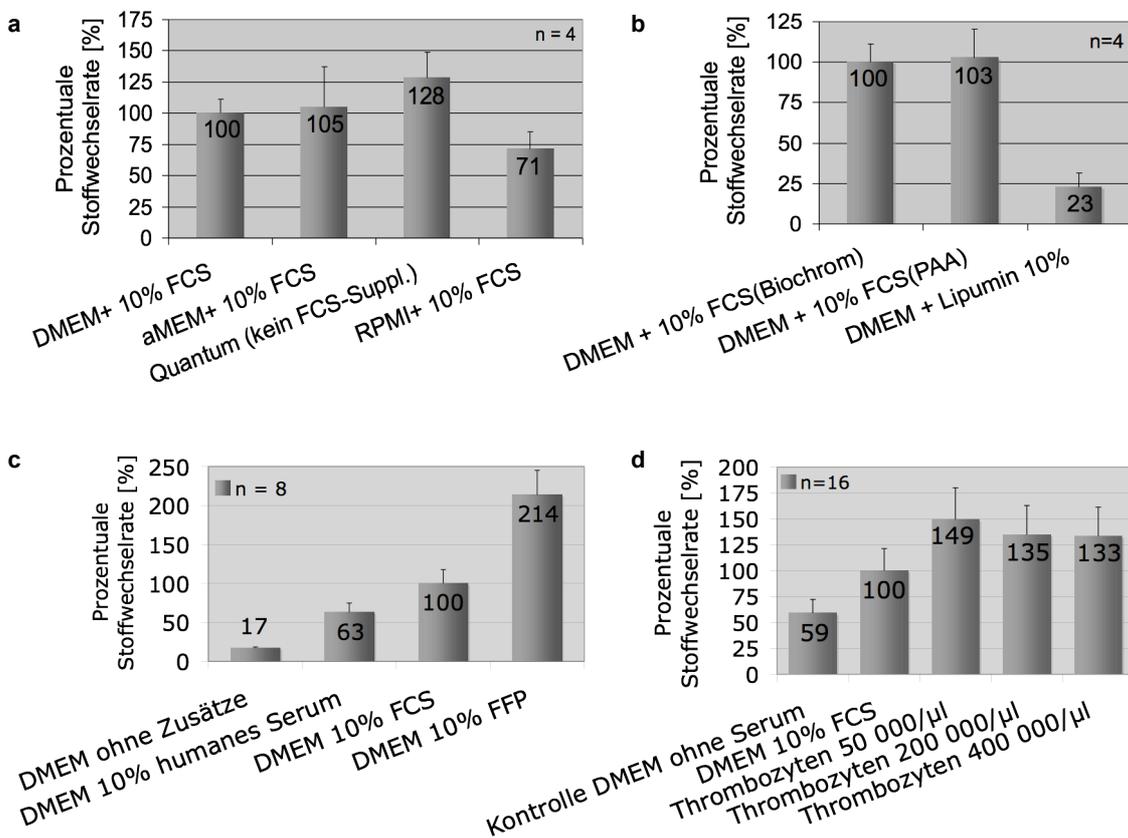


Abb. 4-12: Proliferationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Kulturmedium. Die Werte sind prozentual im Vergleich zur Wachstumsrate in DMEM mit 10% FCS entsprechend dem Standardmedium dargestellt. (a) zeigt den Vergleich verschiedener Basismedien (Probenumfang n = 4). In (b) FCS der Firmen Biochrom und PAA im Vergleich, außerdem der Serumersatzstoff Lipumin (PAA) (n=4), in (c) ist der Zusatz von humanem Serum, FCS und FFP gezeigt (n = 8). Thrombozyten eignen sich gut als Wachstumssupplement im Austausch gegen FCS. Deutlich höhere Proliferationsraten konnten anhand der höheren Extinktion abgeleitet werden (d) (n=16).

4.1.7 Proliferationsrate in Abhängigkeit vom Serumzusatz

Fetales Kälberserum

Äquivalent zum FCS-Gehalt des Standardmediums wurden alternative Wachstumskomplemente zugesetzt. In den Abbildungen 4-12 a - d sind die Ergebnisse in Bezug zum gemittelten Messwert in DMEM mit 10% FCS gesetzt.

Der Serumersatzstoff Lipumin

Der von der Firma PAA zur Verfügung gestellte Serumersatzstoff Lipumin[®] wurde ursprünglich als Wachstumssubstrat ohne tierische Bestandteile für Fibroblastenkulturen entwickelt. Lipumin[®] eignete sich nicht für die *in vitro*-Expansion von MSC wie Abbildung 4-12 b zeigt. Es zeigte sich eine Abnahme von Größe und Proliferationsgeschwindigkeit.

Humanes Serum / Humanes Plasma

Obwohl erste Proliferationsassays mit humanem Serum eine hohe Teilungsrate der MSC aufwiesen, zeigte sich nach einer längeren Kulturdauer Wachstumsstillstand und nach vier bis sechs Passagen schließlich der Zelltod. Die Zellen bildeten Kluster und degenerierten.

Anders als mit humanem Serum als Wachstumskomplement blieb beim Zusatz von frischem humanem Plasma mehrere Passagen hindurch eine hohe Teilungsrate bestehen. Es kann als *fresh frozen plasma* aus Blutbanken bezogen werden kann. Wie in Abb. 4-12 c zu sehen, lag die Stoffwechselaktivität sogar deutlich über der unter Standardbedingungen gemessenen.

Thrombozyten als Wachstumssupplement

In dem in Abbildung 4-12 d gezeigten MTS-Assay wurde das FCS durch Thrombozyten in unterschiedlicher Konzentration ersetzt. Die Thrombozyten stammten zum einen aus frischen Präparationen von peripherem Blut, andererseits aus Thrombozytenkonzentraten der Blutspendezentrale Tübingen.

Durch Ultrazentrifugation ein Thrombozytenhomogenat, hergestellt, um interne Substratspeicher zu leeren.

Während das Homogenat schlecht abschnitt, erbrachte ein Zusatz von frisch isolierten, vitalen Thrombozyten eine deutliche Steigerung der Wachstumsrate. Die Ergebnisse lagen damit um rund die Hälfte höher als im Standardmedium. Dies war deutlich zu sehen bei einer Thrombozytenkonzentration, die der physiologischen Konzentration in etwa entspricht ($1,5 - 3,5 \times 10^5/\mu\text{l}$ Vollblut). Höhere Konzentrationen erbrachten keinen zusätzlichen Nutzen.

4.1.8 Andere Organische und anorganische Zusätze

Pyruvat

Die Hauptenergiequelle des zellulären Stoffwechsels von Säugetieren ist Glukose. Mittels Glykolyse wird die Glukose zu Pyruvat verstoffwechselt und so dem Citrat-Zyklus zugeführt. Zusätzlich wurde deshalb Natrium-Pyruvat als Energiequelle zugesetzt, das direkt in den Citrat-Zyklus der Zellen eingehen sollte. Wider Erwarten nahm die Stoffwechselrate unter erhöhtem Pyruvatgehalt ab.

Calcium

Mesenchymale Stammzellen besiedeln in ihrer Funktion als Stromasupportzellen für hämatopoetische Zellen endosteliale Proliferationsnischen des Knochenmarks, die nahe den Knochenbälkchen liegen. Ein calciumreiches, hypoxisches Millieu könnte demnach einen positiven Effekt auf das Wachstum von MSC nehmen. In diesem Ansatz sollte der Einfluss des Calciumgehalts auf die Wachstumsrate der MSC untersucht werden. Eine Erhöhung der Wachstumsrate ließ sich nicht bestätigen. Mit steigender Konzentration an Calciumchlorid nahm sie ab, was mit einer zytotoxischen Wirkung zu erklären ist (s. Abb. 4-13).

Pyruvatgehalt	OD [490-630nm]	Prozentual [%]
DMEM 10% FCS, 1 mM Pyruvat	0,389 ± 0,121	100 ± 11,1
DMEM 10% FCS, 2 mM Pyruvat	0,239 ± 0,064	64,2 ± 17,1
DMEM 10% FCS, 3 mM Pyruvat	0,223 ± 0,061	60,0 ± 16,5

Tab. 4-1: Stoffwechselaktivität in Abhängigkeit von der zugesetzten Pyruvatkonzentration. Zusätzlich zugesetztes Pyruvat hatte keinen positiven Effekt (n=4).

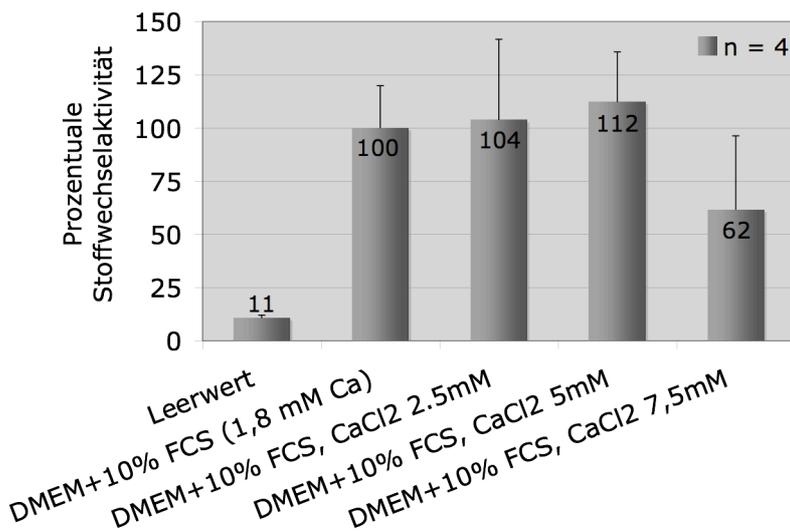


Abb. 4-13: Die Erhöhung der Calciumkonzentration im Medium wirkte sich positiv auf das Proliferationsverhalten der MSC aus.

4.2 Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Im Gegensatz zum stabilen Genomeinbau via retroviraler Transduktion führt die Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation mit einer ringförmigen Plasmid-DNA in der Regel nur zur vorübergehenden (transienten) Präsenz eines Reportergens in der Zelle. Diese kostengünstige Methode eignet sich aufgrund der einfachen Durchführung gut für präklinische Studien. In einer Lösung aus Calciumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Setzt sich das Präzipitat auf einer adhären wachsenden Zellkultur ab, werden die ausgefallenen Kristalle von den Zellen wahrscheinlich durch einen calciumabhängigen Endozytosevorgang aufgenommen⁷⁹.

Als Reporter gen diente eGFP (*enhanced green fluorescent protein*), eine Mutante des Wildtyps, die ein intensiveres Fluoreszenzsignal als GFP hervorbringt. Die Transfektion mittels Calcium-Chlorid-Präzipitation gelang bei MSC problemlos und mit einer hohen Konversionsrate von über 50%. Die Vitalität betrug durchschnittlich etwa 80%. Nach der Transfektion spannten sich die Zellen weit aus und besaßen eine trianguläre bis sternförmige Form (Abb. 4-14). Bei Konfluenz legten sie sich spindelförmig aneinander. Sie unterschieden sich somit nicht von der Standardkultur. Die Proliferationsrate nahm gegenüber der Standardkultur ab, die Zellen teilten sich weiterhin, waren aber sehr empfindlich gegenüber der Trypsinierung beim Splitten der Kultur oder bei der Platzierung auf einen Objektträger.

4.3 Homing der GFP-transduzierten MSC in transplantierten NOD/LtSz-Rag^{-/-}-Mäusen

Als Markerprotein für die transplantierten humanen MSC in NOD/LtSz-Rag^{-/-}-Mäuse wurde nukleares eGFP verwendet. Der genomische Einbau des zugehörigen Gens mittels retroviraler Transduktion führt zu einer stabilen Expression des Fluorophors auch bei Zellteilung oder bei Differenzierung der multipotenten Zellen nach der Transplantation.

Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich das Signal der eGFP-markierten Zellen auf den Schnittpräparaten nicht direkt detektieren. Um die Autofluoreszenz des umgebenden Gewebes zu überstrahlen, muss die Anzahl der Kopien des eGFP-Gens mindestens 10^5 pro Picoliter Zellvolumen betragen. Bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde keine markierte Zelle gefunden. Um das vermutlich schwache Signal des grün-fluoreszierenden Proteins zu amplifizieren, wurden die Gewebsschnitte mit einem GFP-bindenden Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt, der es ermöglicht, das verstärkte Signal mit Hilfe einer Farbreaktion sichtbar zu machen. Hierzu wurde der NovaRED Peroxidase-Kit[®] von VectorLabs gewählt, der ein Farbsignal hervorruft, das sich auch nach May-Grünwald-Gegenfärbung deutlich abhebt.

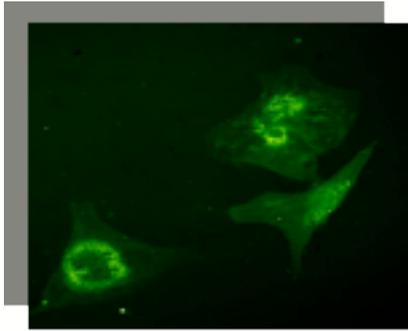


Abb. 4-14: MSC nach Transfektion mit N-GFP

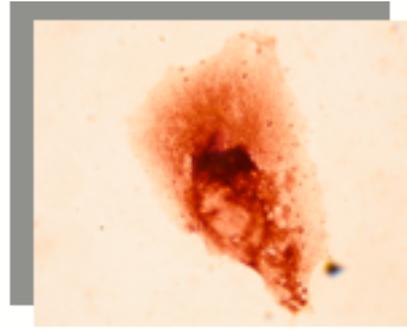


Abb. 4-15: MSC nach Transfektion mit N-GFP, Immunhistochemie

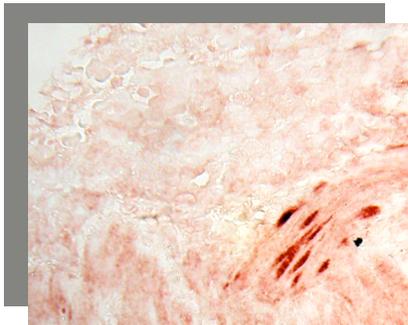


Abb. 4-16: Lunge, 400-fach, Bronchuswand

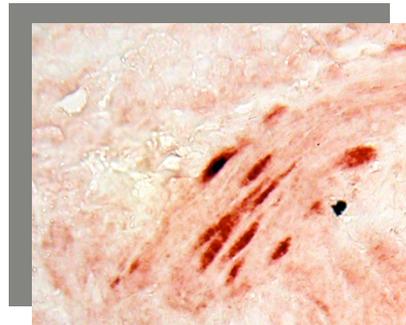


Abb. 4-17: Lunge, 1000-fach, Bronchuswand



Abb. 4-18: Lunge, 1000-fach, Alveolardeckzelle

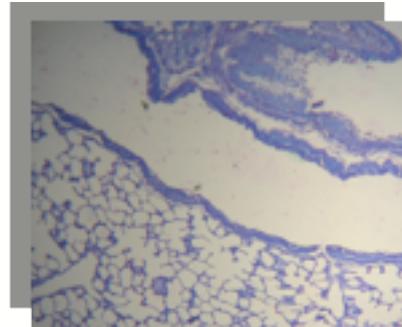


Abb. 4-19: Kontrolle, 200-fach, May-Grünwald-Gegenfärbung

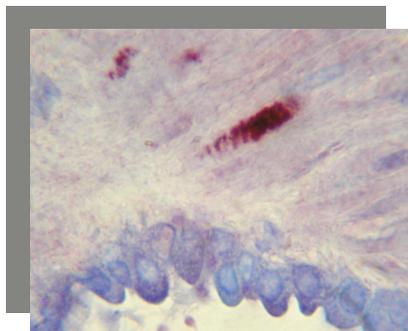


Abb. 4-20: Lunge, 1000-fach, Bronchuswand, May-Grünwald-Gegenfärbung

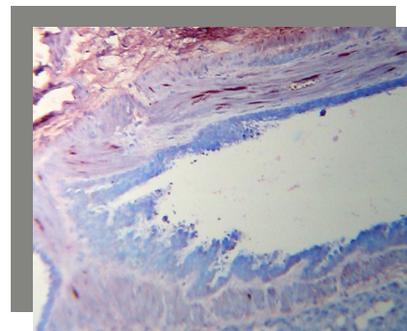


Abb. 4-21: Lunge, 200-fach, Bronchuswand, May-Grünwald-Gegenfärbung

Die Auswertung am Auflichtmikroskop zeigte wenige, in Gruppen angeordnete spindelförmige Zellen mit roter Anfärbung des Zytoplasmas in Präparaten der Lunge, die sich zumeist in der Wand der Bronchien nachweisen ließen (Abb. 4-16 bis 4-21). Einzelne angefärbte rundliche Zellen wurden im Alveolarepithel gefunden (Abb. 4-18). Ob diese den Phänotyp mesenchymaler Stromazellen, Alveolarmakrophagen oder Alveolardeckzellen trugen, konnte ohne weitere Untersuchungen nicht festgestellt werden. In anderen Organen konnten keine markierten Zellen gefunden werden.

4.4 Enzymaktivitäten

Eine der Fragen, denen in dieser Arbeit nachgegangen werden sollten, beschäftigt sich mit der Möglichkeit, mesenchymale Stromazellen zur Therapie neurometabolischer Erkrankungen im Kindesalter heranzuziehen. Folglich wurden MSC bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität untersucht. Schwerpunktmäßig wurden hierbei die Enzyme Arylsulfatase A, β -Galaktosidase und β -Hexosaminidase A und B betrachtet, die bei Erkrankung an Metachromatischer Leukodystrophie, GM₁-Galaktosidose, Morbus Tay-Sachs beziehungsweise Morbus Sandhoff nicht oder in verringertem Maße für den Abbau von Zellstoffwechselprodukten in den Lysosomen der Körperzellen zur Verfügung stehen.

4.4.1 Expression der vier untersuchten lysosomalen Enzyme

Die Messung der lysosomalen sowie der sekretorischen Aktivität erfolgte wie in 3.2.6 beschrieben. Der Probenumfang betrug bei den Versuchen 4.3.1 und 4.3.2 jeweils vier ($n = 4$), bei den Versuchen 4.3.3 und 4.3.4 zwei Proben ($n = 2$). Die Änderung der optischen Dichte ist umgerechnet auf Einheiten pro 10^6 Zellen angegeben. Die Berechnung erfolgte auf Grundlage des prozentualen Anteils der Enzymaktivität im Zellpellet beziehungsweise des Überstandes der einzelnen Proben, woraus dann der Mittelwert errechnet wurde. Zunächst wurde die intrazelluläre Enzymexpression in MSC untersucht. Wie Abb. 4-22 a zeigt, lassen sich alle vier Enzyme in MSC gesunder Spender nachweisen.

Enzymexpression nach Langzeitkultur

Auch nach einer Kulturdauer von drei Monaten konnte eine kaum verringerte Enzymaktivität detektiert werden (s. Abb.4-22 b).

4.4.2 Arylsulfatase A-Abgabe durch MSC

Im Folgenden sollte nun die Sekretion der fokussierten Enzyme ins umgebende Medium geprüft werden. Exemplarisch ist dies in den Abbildungen 4-22 c und d für die Arylsulfatase A dargestellt. Die beiden Versuche 4.3.3 und 4.3.4 wurden im Transwellsystem durchgeführt, wobei Zellen gesunder Spender durch eine semipermeable Membran mit der Porengröße 0,8 µm getrennt von Arylsulfatase A-defizienten Fibroblasten (MLD-Fibroblasten) von Probanden mit Metachroma-

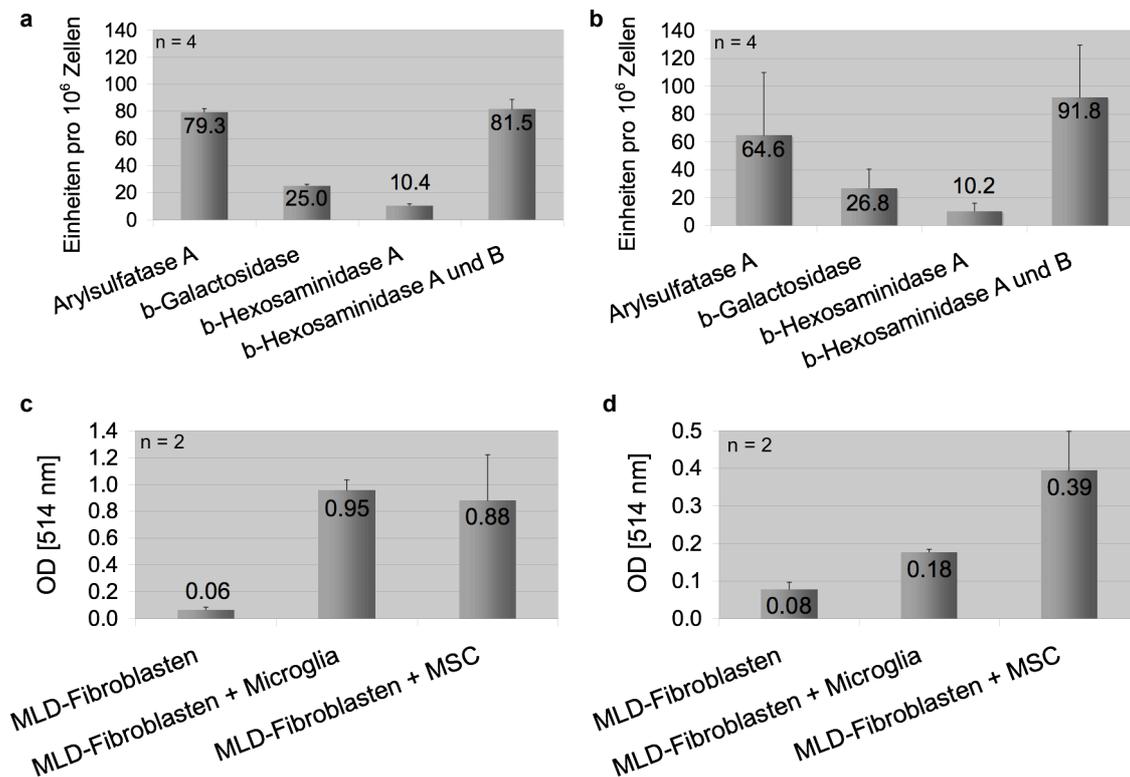


Abb. 4-22 a und b: Enzymaktivitäten gemessen im Zellhomogenat mesenchymaler Stammzellen gesunder Spender. (a) zeigt die Enzymaktivität nach 1 Woche Kulturdauer, (b) das Ergebnis nach 3 Monaten (Enzymaktivität bezogen auf 10⁶ Zellen, Probenumfang n = 4).

Abb. 4-22 c und d: Die Diagramme zeigen die Enzymaktivität von Arylsulfatase A nach einwöchiger Co-Kultur von MLD-Fibroblasten und Microgliazellen beziehungsweise MSC gesunder Spender. (c) zeigt die Enzymaktivität gemessen im Kulturmedium, (d) im Homogenat der MLD-Fibroblasten. Es erfolgte also nicht nur eine Enzymabgabe ins Kulturmedium, sondern auch eine Aufnahme durch die enzymdefizienten Fibroblasten (Probenumfang n = 2).

tischer Leukodystrophie kultiviert wurden. Der Arbeitshypothese zufolge sollten die gesunden MSC die von ihnen exprimierten Enzyme in das Medium abgeben, und die defizienten Zellen in der Lage sein, das entsprechende Enzym aufzunehmen und somit ihren Stoffwechsel zu korrigieren. Den qualitativen Vergleich lieferten Mikroglia gesunder Spender, die schon in vorhergehenden Untersuchungen zur Entwicklung einer optimierten Labor-diagnostik bei Sphingolipid-Speicherkrankheiten herangezogen wurden.

Nach durchschnittlich einer Woche wurde das Medium abgenommen und auf den Gehalt von Arylsulfatase A untersucht. Im Überstand der reinen MLD-Fibroblasten-Kultur war mit einer Extinktion von $0,06 \pm 0,02$ eine sehr geringe Enzymaktivität zu verzeichnen. Die Aktivität im Medium der co-kultivierten Fibroblasten lag um ein Vielfaches höher und war bei der Kultur zusammen mit MSC ähnlich der Kultur mit Mikroglia ($0,88 \pm 0,34$ versus $0,95 \pm 0,08$).

4.4.3 Arylsulfatase A-Aufnahme durch MLD-Fibroblasten

Die tatsächliche Arylsulfatase A-Aufnahme durch MLD-Fibroblasten ließ sich anhand der enzymatischen Aktivität im Zellhomogenat feststellen. Während die Proben der reinen MLD-Fibroblasten-Kultur eine sehr geringe Extinktion entsprechend der Enzymaktivität von durchschnittlich $0,08 \pm 0,02$ aufwiesen, stieg die Extinktion nach Co-Kultur mit MSC gesunder Spender auf $0,39 \pm 0,10$ an, und war damit doppelt so hoch wie die der zusammen mit Mikroglia inkubierten Fibroblasten ($0,18 \pm 0,01$).

5 DISKUSSION

Unter anderem haben gesetzliche Restriktionen und ethische Probleme im Umgang mit humanen embryonalen Stammzellen dazu geführt, dass sich Forscher zunehmend auf adulte Stammzellen konzentrieren. Hierzu kommt, dass adulte Stammzellen gut verfügbar sind und im autologen wie auch allogenen Setting verwendet werden können. Mesenchymale Stammzellen umfassen eine multipotente Zellpopulation, die sich durch hohe Proliferationsfähigkeit, eine gewisse Plastizität und die Fähigkeit zur Immunmodulation auszeichnen. Durch ihre Multipotenz stehen MSC im Fokus der Regenerationsmedizin vieler Fachgebiete. Sie könnten zur Regeneration von Organen (z.B. Leber, Herz) und Geweben (Tissue-Engineering, z.B. Knochen⁸⁰, Knorpel), als Zellersatztherapie und bei Reparaturvorgängen und Immunmodulation in peripherem und zentralem Nervensystem eingesetzt werden. Im Tiermodell wurden diese therapeutischen Ansätze getestet⁸¹, Pilot-Studien und erste Phase I/II- Studien am Menschen sind abgeschlossen, mit unterschiedlichen Resultaten betreffend der Wirksamkeit^{82,83}. Insgesamt zeigte sich eine gute Verträglichkeit einer Übertragung von MSC. Ermutigende Ergebnisse erbrachten der Einsatz von mesenchymalen Stromazellen zur schnelleren Regeneration und Immunmodulation nach allogener Knochenmarktransplantation und die Co-Transplantation von MSC und HSC, die Graft-versus-Host-Erkrankungen stark mildern können⁸⁴. Nach Nierentransplantationen verhinderten MSC die Proliferation von alloaktivierten Empfänger-T Zellen⁸⁵

MSC sind wie die hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark beheimatet, eine Isolation aus anderen Geweben (Fettgewebe, Wharton-Sulze der Nabelschnur) wurde mehrfach beschrieben⁸⁶. Ihre geringe Konzentration in adulten Geweben setzt die Expansion *ex vivo* voraus, bevor sie unter verschiedensten Fragestellungen klinisch eingesetzt werden können. Die therapeutische Verwendung unter der Bedingung der Minimierung der Risiken von Infektion und Immunreaktionen erfordert die Herstellung nach den Leitlinien

der „*good manufacturing practice*“ (GMP) und damit den weitestgehenden Verzicht auf den Einsatz von Produkten tierischer Herkunft in der Kultur.

Die klinische Verwendung der MSC sollte im Blickfeld der vorliegenden Arbeit stehen. Ihre Transplantierbarkeit und Enzymstoffwechsel könnten ihnen einen festen Platz in der therapeutischen Anwendung insbesondere bei neuro-metabolischen Erkrankungen im Kindesalter einräumen. Für die Mehrzahl der Erkrankungen dieser heterogenen Gruppe gibt es bisher keine kausale Therapie, bei einigen kann allogene Knochenmarktransplantation den Verlauf der Erkrankung verzögern oder sie vielleicht ganz verhindern. Die Transplantation mesenchymaler Stromazellen könnte eine potente und schonende Ergänzung darstellen. Ein Gentransfer könnte in weiterer Zukunft hierbei die gezielte Steigerung der enzymatischen Korrekturwirkung der infundierten MSC ermöglichen.

5.1 Interpretation der Ergebnisse

5.1.1 Der Einfluss des Kulturmediums

Die gewählten Oberflächenmarker zeigten eine stabile Expression in DMEM mit 10% FCS, das als Standardmedium für die vorklinischen Versuche verwendet wurde. Die Untersuchung der Oberflächenmarker im Medium mit Thrombozyten als Wachstumssupplement stand bei Abschluss der vorliegenden Arbeit noch aus. Sie sind jedoch im Hinblick auf die Entwicklung eines Mediums nach GMP-Leitlinien von Bedeutung. Mesenchymale Stromazellen sind eine heterogene Population, für die bisher keine einheitlichen Identifikationsmerkmale festgelegt wurden. Je nach Herkunftsgewebe (Fettgewebe, Knochenmark, Wharton-Sulze) unterscheiden sich MSC leicht in ihren Oberflächenproteinen. Auch unter isolierten MSC lassen sich Subpopulationen unterscheiden⁸⁷. MSC waren auf die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 stark, CD106 und CD146 in geringerem Maße positiv, auf CD34 und CD45 negativ. Die Ergebnisse zeigen, dass das Kulturmedium einen Einfluss auf die Stärke der Expression von Oberflächenmolekülen haben kann. Unterschiedliche Expressionsdichte

konnten bei CD90 und CD105 festgestellt werden. Dies bedeutet einerseits, dass die Phänotypisierung unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Ergebnisse erbringen kann, was zum Beispiel die Identifizierung von MSC erschweren kann. Auf der anderen Seite bedeutet es, dass die Zusammensetzung des Kulturmediums bei Expansion *in vitro* Einfluss auf Eigenschaften und das Differenzierungspotential der MSC nimmt. Allerdings kann von der Veränderung der Eigenschaften *in vitro* nicht auf die Distribution und Differenzierung *in vivo* geschlossen werden. Zumal die genauen Faktoren, die beim Homing der Zellen eine Rolle spielen, weitgehend unbekannt sind.

Kulturmedien auf DMEM- oder α MEM-Basis sind geeignet für die schnelle Expansion von MSC *in vitro*. Tierische Bestandteile sollten zur Risikominimierung in der klinischen Anwendung nicht eingesetzt werden, da neben der Übertragung von Infektionskrankheit ist die Immunogenität xenogener Stoffe ein Risiko darstellt. Bei Ersatz von FCS durch Thrombozytenkonzentrat in physiologisch vorkommenden Konzentrationen oder FFP konnte zudem eine Steigerung der Proliferationsrate erreicht werden. Die MSC veränderten sich hierunter morphologisch nur wenig. Zu untersuchen ist noch, ob MSC unter diesen Bedingungen auch in ihren Eigenschaften stabil bleiben. Prinzipiell ist die Transplantation von MSC so vollständig im autologen Modell möglich.

Ein Kontaminationsrisiko besteht auch ausgehend von Hilfsstoffen im Verarbeitungsprozess, sie sollten ein minimales Gesundheitsrisiko mit sich bringen. Trypsin wird im Allgemeinen aus Schweinepankreas gewonnen. In den Versuchen wurde Trypsin-EDTA der Firma Biochrom verwendet, das mittels PCR auf Mykoplasmen und Schweine-Parvovirus getestet wird. Grundsätzlich wäre auch eine Übertragung anderer Infektionskrankheiten denkbar. Das Risiko immunogener Reaktionen kann verringert werden, wenn vor Transplantation MSC von anderen Zellbestandteilen getrennt und mehrmals gewaschen werden. Accutase[®] (Firma PAA), die sich aus proteolytischen und collagenolytischen Enzymen zusammensetzt und aus einer wirbellosen Spezies gewonnen wird, wird trotz des fehlenden Risikos der Übertragung von Erregern

aus dem Säugetiergut nicht für die klinische Anwendung empfohlen.

Neben der Aufzucht der mesenchymalen Stromazellen im autologen System sollten auch die Möglichkeiten der Transplantation am murinen Modell ausgelotet werden. Mit Hilfe eines Vektors wurden humane MSC mit eGFP markiert und in die Schwanzvene von NOD-LtSz-Rag^{-/-}-Mäusen injiziert. Die Transfektion mit eGFP stand Modell für die denkbare Genmodulation von MSC zur verstärkten Expression eines defizienten Enzyms, zum Beispiel Arylsulfatase A.

5.1.2 Das Mausmodell: Transplantation GFP-transduzierter humaner MSC in NOD-LtSz-Rag^{-/-}-Mäuse

Im verwendeten Mausmodell waren sehr wenig klar identifizierbare MSC wiederzufinden. Mehrere Gründe sind denkbar. MSC sind vergleichsweise große Zellen verglichen mit anderen Zellen einer Spezies. Die Transfusion humaner MSC könnte bei Injektion in die Schwanzvene der Mäuse zur Thrombosierung geführt haben und so die weitere Passage verhindert haben. Literaturangaben beschreiben bessere Untersuchungsergebnisse, wenn die Versuchstiere erst 9 – 21 Monaten nach der Transplantation untersucht wurden als nach 4 Wochen, wie auch in der vorliegenden Arbeit⁸⁸. Unklar blieb den Autoren, ob Proliferation oder Redistribution der Zellen aus Lunge oder Knochenmark für die höhere MSC-Dichte in peripheren Organen für diesen Effekt verantwortlich ist. Uneinigkeit besteht auch über die Bedeutung des Homings im Knochenmark nach allogener Transplantation, das eventuell wegen konkurrierender autologer MSC gering ist. Um nachzuweisen, dass es sich bei den gezeigten Zellen um MSC handelt, die sich zu Myozyten differenziert haben, müssen die Gewebsschnitte nochmals aufbereitet und die GFP-positiven Zellen auf muskuläre Proteine, beispielsweise auf Alpha-Actin oder Desmin untersucht werden. Eine sensitivere Methode als die mikroskopische Untersuchung von Gewebsschnitten nach histochemischer Aufbereitung ist der Nachweis bestimmter humanspezifischer Gensequenzen mit der PCR. Diese Methode ist außerdem dazu geeignet, eine Differenzierung

der MSC in verschiedene Gewebe nachzuweisen. Auszuschließen ist eine Fusion der MSC mit Empfänger-Myozyten. Die markierten Zellen können hierzu per Laser-Mikrodissektion aus den Gewebsschnitten ausgeschnitten und der PCR zugeführt werden.

5.1.3 Transfektionsversuche

Die Calcium-Phosphat-Präzipitation wies eine ordentliche Transfektionsrate und eine geringe Toxizität für MSC auf. Die Proliferationsgeschwindigkeit nahm nach Transfektion allerdings deutlich ab. Insgesamt stellt die Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation eine einfache Methode mit recht hoher Effizienz dar. Da zunächst kein stabiler Einbau des Vektors in die DNA erfolgt, nimmt die Proteinsynthese, hier das GFP-Signal, infolge der Verteilung der Plasmidkopien auf die Tochterzellen bei jeder Teilung der Zellen und infolge des Abbaus im Zytoplasmas ab. In einem Teil der Zellen erfolgt die genomische Rekombination und somit eine stabile Expression über mehrere Zellzyklen. Eine Selektion von Zellen mit stabiler Expression des Proteins könnte bei Neomycin-Resistenz durch Zusatz von G418 erreicht werden. Zur Herstellung einer stabilen transgenen Zelllinie eignet sich besser die retrovirale Transduktion, die es auch ermöglicht, den Vektor in mehreren Repliken in die Carrier-DNA zu integrieren. Im klinischen Einsatz ist die retrovirale Transduktion die Methode der Wahl, um eine große Anzahl von Zellen zuverlässig genetisch zu modifizieren.

Als letztes sollte die Exkretionsfähigkeit von MSC bezüglich der betreffenden Enzyme Arylsulfatase A, β -Hexosaminidase A und B und β -Galaktosidase untersucht werden. Auch sollte anhand der Arylsulfatase A geprüft werden, ob defiziente Zellen in der Lage sind, die sezernierten Enzyme aufzunehmen.

5.1.4 Enzymaktivitäten

Da die Enzymaktivität im Zellhomogenat gemessen wurde, kann aus den Ergebnissen nicht automatisch auf die Aufnahme des untersuchten Enzyms in die Zellen geschlossen werden. Arylsulfatase A könnte theoretisch auch

unspezifisch auf der Zelloberfläche gebunden sein. Durch Blockierung der zur Endozytose benötigten Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren ließ sich die tatsächliche lysosomale Aufnahme der Hydrolase erkennen (nicht gezeigt). Auswirkungen auf den Stoffwechsel der MLD-Fibroblasten wurden nicht untersucht. So konnte bisher nicht gezeigt werden, ob die enzymatische Korrektur die weitere Ablagerung von Metaboliten mindert oder gar zu einer Verringerung der abgelagerten Masse an Metaboliten führt.

5.1.5 Ausblick

Trotz signifikanter histologischer und elektrophysiologischer Veränderungen zeigten sowohl Untersuchungen am Tiermodell als auch am Menschen bisher einen begrenzten klinischen Benefit von Transplantationen mesenchymaler oder hämatopoetischer Stammzellen bei neurometabolischen Erkrankungen. Das Fortschreiten der Erkrankung konnte verlangsamt, aber nicht gestoppt werden. So war eine Reduktion des Speichermaterials in Lysosomen in Mäusen zu erkennen, die zuvor⁸⁹. Trotz der Verbesserung der Nervenleitgeschwindigkeit sowie eine Stagnation des Knochenabbaus bei Patienten mit MLD nach Transplantation von MSC des gleichen Spenders (HLA-identisches Geschwisterkind) nach allogener KMT nachgewiesen wurde, verbesserte sich das klinische Outcome nicht merklich⁷⁷. Eine kombinierte Transplantation von HSC und MSC könnte das Engraftment verbessern und das Risiko einer GvHD verringern. MSC können ohne das risikoreiche Transplantationsregime von HSCT transplantiert werden, da sie keine Immunreaktion hervorrufen. Die therapieassoziierte Mortalität (TRM, *transplantation related mortality*) der autologen Knochenmarktransplantation liegt bei ca. 6% - 7%⁹⁰. Auch eine Transplantation von HSC bei nichtmalignen Erkrankungen nach einem reduzierten Konditionierungsregime ist mit schwerwiegenden Eingriffen in gesunde Körperstrukturen aufgrund von opportunistischen Infektionen und GvHD verbunden. Die Behandlung neurometabolischer Krankheiten sollte vor Auftreten von Symptomen begonnen werden, da bestehende Defekte nur zu geringem Teil reversibel sind. Realistisch ist dies bisher nur in Familien mit einem diagnostizierten Kind, wenn bei erneuter Schwangerschaft eine

pränatale Diagnostik durchgeführt wird. Ein Routine-Screening Neugeborener gibt es nicht, auch wenn inzwischen für einige Sphingolipidosen ein dem Guthrie-Test ähnlicher Filterpapieretest entwickelt wurde, der auf einer Antikörperbindungsreaktion der Proteine LAMP-1 und LAMP-2 sowie einer massenspektrometrischen Untersuchung von Saposin beruht⁹¹.

Aufgrund ihres geringen Anteils in Aspiraten von Knochenmark müssen MSC vor der Anwendung *ex vivo* expandiert werden. Eine Steigerung der Sekretion aus den Produzentenzellen hat eine Erhöhung der Menge an verfügbarem therapeutischem Enzym zufolge. Die Transplantation retroviral transduzierter HSC in Arylsulfatase A-defizienten Mäusen zeigte vielversprechende Ergebnisse⁸⁹. In ähnlicher Weise könnten somit genetisch modifizierte MSC eine autologe wie auch allogene Quelle des defizienten Enzyms ohne nennenswerte Nebenwirkungen darstellen, dies allerdings erst, wenn die Risiken einer Manipulation des Genoms einer Zelle als gering einzustufen sind. MSC überwinden, wie auch Makrophagen der HSC-Fraktion, die im Gehirn zu Gliazellen werden, die Blut-Hirn-Schranke¹⁸⁹². Durch die Überexpression des Enzyms, die bisher noch keine adversen Effekte hervorrief, ist eine starke Korrekturwirkung zu erwarten⁹³. Auch ein Sättigungseffekt des gemeinsamen Aktivators aller Sulfatasen SUMF-1 (*sulfatase modifying factor 1*), der eine Einschränkung im lysosomalen Gesamtstoffwechsel bedeuten würde, wurde nicht beobachtet⁹⁴. Andere Untersuchungen am Mausmodell gingen von einer genetischen Modifikation *in situ* aus⁹⁵. Die enzymatische Korrektur war hierbei nicht nur um die Injektionsstelle festzustellen, es resultierte auch ein axonaler Transport des Enzyms in verknüpfte Hirnregionen. Gegenstand aktueller Forschung sind Sicherheitsmechanismen gegen Malinsertionseffekte und onkogene Transformation der genetisch veränderten Zellen durch unerwünschte Aktivierung von Protoonkogenen oder Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen. Spezielle Promoter sollen eine gezielte und langanhaltende Transkription gewährleisten. Weil Langzeit-Followups noch ausstehen, ist bisher unbekannt, ob die Therapie mit MSC in regelmäßigen Abständen wiederholt werden muss oder ob durch dauerhaften Chimerismus, eventuell

nach mehreren Gaben, eine stabile Enzymsekretion erfolgt. Es gibt Hinweise, dass nicht alle mesenchymalen Stammzellen das gleiche Differenzierungspotential besitzen und dass das Differenzierungsmuster mit dem Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle korreliert. Durch eine Auswahl nach Expressionsmuster könnte eine bessere Selektion *in vitro* erfolgen. Weitere Untersuchung der Transplantationseigenschaften und immunogenen Eigenschaften von MSC sind notwendig.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte das Potential mesenchymaler Stromazellen in der klinischen Anwendung bei neurometabolischen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter untersucht werden. Die Arbeitshypothese besagte, dass mesenchymale Stromazellen wegen fehlender MHC I-Moleküle transplantiert werden können, ohne eine Abstoßungsreaktion im Empfänger hervorzurufen. Nach systemischer Infusion sollten sie Organe und Gewebe endo-, meso- und ektodermaler Herkunft besiedeln, bevorzugt aber Areale mit Gewebeschädigung wie im Mausmodell gezeigt wurde. Da bei den neurometabolischen Erkrankungen durch zellulär angehäufte Stoffwechselintermediate insbesondere im zentrale und periphere Nervensystem schwere Schäden hervorgerufen werden, die in bisherigen Therapieansätzen kaum reversibel waren, sind die außerordentliche Plastizität, etwa in neuronales Gewebe zu differenzieren, und die Fähigkeit mesenchymaler Stromazellen die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten von großem Interesse. So wurde einerseits die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass mesenchymale Stromazellen geschädigtes Gewebe nach entsprechender Differenzierung ersetzen, andererseits eine *cross correction* (Stoffwechselkorrektur durch Austausch von Enzymen) enzymdefizienter Zellen stattfinden könnte.

MSC konnten in einfacher Weise aus überschüssigem Material von diagnostischen Knochenmarkpunktionen aus dem Beckenkamm isoliert und *in vitro* expandiert werden. Die ausgewählten Oberflächenmarker CD34, CD75, CD90 und CD105, zusätzlich CD106 und CD146, charakterisierten die adhären, trianguläre bis spindelförmige Zellen als mesenchymale Stromazellen. Um optimale Expansionsbedingungen zu schaffen, wurden die Kulturmedien DMEM, AMEM, RPMI und Quantum 333 miteinander verglichen. Ebenso wurden verschiedene Konzentrationen von Pyruvat und zweiwertigem Calcium sowie FCS verschiedener Hersteller und der Austausch von FCS gegen isolierte humane Thrombozyten aus Thrombozytenkonzentraten sowie FFP getestet. Während in den Basismedien DMEM, AMEM und Quantum333

unter vergleichbaren Bedingungen die genannten Oberflächenmarker ähnlich exprimiert waren, wurde vor allem CD105 in RPMI vermindert exprimiert. Beste Wachstumsvoraussetzungen ergaben sich in DMEM.

Enzymatische Essays zeigten, dass mesenchymale Stromazellen die lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A, Hexosaminidase A und B und β -Galaktosidase exprimieren und in die Umgebung sezernieren. Wurden Fibroblasten eines MLD-Patienten ohne ASA-Expression mit MSC co-kultiviert, nahmen sie die sezernierten Arylsulfatase A auf. Bei Markierungsversuchen mit plasmid-kodiertem eGFP konnten durch die Calcium-Phosphat-Präzipitation gute Effizienzen erzielt werden. Um das Homing von MSC zu untersuchen, wurden GFP-markierte humane MSC in NOD/LtSz-Rag^{-/-}-Mäuse infundiert. Es konnten mehrere markierte Zellen in Dünngewebsschnitten der Lunge detektiert werden, der Nachweis in anderen Organen gelang nicht.

Der Einsatz von MSC in der Behandlung von neurometabolischen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter ist eine Therapieoption, die weitere präklinische und klinische Untersuchungen erfordert.

-
- ¹ Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation. (1968) 6:230-47.
 - ² Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. J Cell Biochem. (1994) 56:283-94.
 - ³ Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. J Clin Oncol. (2000) 18:307-16.
 - ⁴ Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci U S A. (1999) 96:10711-6.
 - ⁵ Dominici M, Pritchard C, Garlits JE, Hofmann TJ, Persons DA, Horwitz EM. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A. (2004) 101:11761-6.
 - ⁶ Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science. (1999) 96:534-7.
 - ⁷ Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol. (2000) 28:875-84.
 - ⁸ Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation. (2002) 105:93-8.
 - ⁹ Tondreau T, Dejeneffe M, Meuleman N, Stamatopoulos B, Delforge A, Martiat P, Bron D, Lagneaux L. Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. BMC Genomics. (2008) 9:166.
 - ¹⁰ Li TY, Shu C, Wong CH, Lo PS, Zhu H, Lau MC, Chan MY, Tsang LL, Gou YL, Chung YW, Chan HC. Plasticity of rat bone marrow-derived 5-hydroxytryptamine-sensitive neurons: dedifferentiation and redifferentiation. Cell Biol Int. (2004) 28: 801-7.
 - ¹¹ Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. J Cell Sci. (1991) 99:131-9.
 - ¹² Niemeyer P, Krause U, Punzel M, Fellenberg J, Simank HG. [Mesenchymal stem cells for tissue engineering of bone: 3D-cultivation and osteogenic differentiation on mineralized collagen] Z Orthop Ihre Grenzgeb. (2003) 141:712-7. German.

-
- ¹³ Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-Like Activity of Mesenchymal Stem Cells: Functional Discrimination Between Cellular Responses to Alloantigens and Recall Antigens. *The Journal of Immunology*. (2003) 171: 3426-3434.
- ¹⁴ Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell JJ, Conget PA. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation*. (2004) 78:503-8.
- ¹⁵ Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. (2003) 101:2999-3001.
- ¹⁶ Kokai LE, Rubin JP, Marra KG. *Plast Reconstr Surg*. The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. (2005) 116:1453-60.
- ¹⁷ Mahmud N, Pang W, Cobbs C, Alur P, Borneman J, Dodds R, Archambault M, Devine S, Turian J, Bartholomew A, Vanguri P, Mackay A, Young R, Hoffman R. Studies of the route of administration and role of conditioning with radiation on unrelated allogeneic mismatched mesenchymal stem cell engraftment in a nonhuman primate model. *Exp Hematol*. (2004) 32:494-501.
- ¹⁸ Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport*. (2001) 12:559-63.
- ¹⁹ Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine*. (2004) 29:1971-9.
- ²⁰ Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. (2001) 97:1227-31.
- ²¹ Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2002) 99:8932-7.
- ²² Le Blanc K, Gotherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, Anneren G, Axelsson O, Nunn J, Ewald U, Norden-Lindeberg S, Jansson M, Dalton A, Astrom E, Westgren M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. (2005) 79:1607-14.
- ²³ Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. (2004) 363:1439-41.
- ²⁴ Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune

modulation. *Cytotherapy*. (2006) 8:559-61.

²⁵ Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. (2004) 363:1439-41.

²⁶ Cilloni D, Carlo-Stella C, Falzetti F, Sammarelli G, Regazzi E, Colla S, Rizzoli V, Aversa F, Martelli MF, Tabilio A. Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal cells following T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. (2000) 96:3637-43.

²⁷ Horn P, Bork S, Diehlmann A, Walenda T, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy*. (2008) 10:676-85.

²⁸ Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R, Jonuleit T. Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. *Eur J Med Res*. (2004) 9:337-44.

²⁹ Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*. (1968) 217:370-1.

³⁰ Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol*. (1991) 9:323-50.

³¹ Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. (1992) 68:869-77.

³² Hattori M, Buse JB, Jackson RA, Glimcher L, Dorf ME, Minami M, Makino S, Moriwaki K, Kuzuya H, Imura H, et al. The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. *Science*. (1986) 231:733-5.

³³ Gieselmann V. Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta*. (1995) 1270:103-36.

³⁴ Münz C. Enhancing Immunity Through Autophagy. *Annual review of immunology*. (2009) 27: 423-449

³⁵ Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*. (2009) 1793:605-14.

³⁶ Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S. *Cell*. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. (1988) 52:329-41.

³⁷ Hasilik A, von Figura K, Conzelmann E, Nehr Korn H, Sandhoff K. Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of beta-hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2. *Eur J Biochem*. (1982) 125:317-21.

³⁸ Carlsson SR, Roth J, Piller F, Fukuda M. Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylactosaminoglycan. *J Biol Chem*. (1988) 263:18911-9.

-
- ³⁹ Fischer J, Hein L, Lüllmann-Rauch R, von Witzendorff B. Tilorone-induced lysosomal lesions: the bisbasic character of the drug is essential for its high potency to cause storage of sulphated glycosaminoglycans. *Biochem. J.* (1996) 315:369-375.
- ⁴⁰ Sandhoff K, Quintern L. Zentralnervöse Sphingolipid-Speicherkrankheiten. *Naturwissenschaften.* (1988) 75: 123-131.
- ⁴¹ Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein, B, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* New-York, McGraw-Hill, 2001.
- ⁴² Amaducci L, Sorbi S, Piacentini S, Bick KL. The first Alzheimer disease case: a metachromatic leukodystrophy? *Dev Neurosci.* (1991) 13: 86-7.
- ⁴³ Conzelmann E, Burg J, Stephan G, Sandhoff K. Complexing of glycolipids and their transfer between membranes by the activator protein for degradation of lysosomal ganglioside GM2. *Eur J Biochem.* (1982) 123:455-64.
- ⁴⁴ Dubois G, Turpin J, Baumann N. P-Nitrocatechol sulfate for arylsulfatase assay: detection of metachromatic leukodystrophy variants. *Adv Exp Med Biol.* (1976) 68:233-7.
- ⁴⁵ Eto Y, Gomibuchi I, Umezawa F, Tsuda T. Pathochemistry, pathogenesis and enzyme replacement in multiple-sulfatase deficiency. *Enzyme.* (1987) 38:273-9.
- ⁴⁶ Burk RD, Valle D, Thomas GH, Miller C, Moser A, Moser H, Rosenbaum KN. Early manifestations of multiple sulfatase deficiency. *J Pediatr.* (1984) 104:574-8.
- ⁴⁷ Biffi A, Cesani M, Fumagalli F, Del Carro U, Baldoli C, Canale S, Gerevini S, Amadio S, Falautano M, Rovelli A, Comi G, Roncarolo MG, Sessa M. Metachromatic leukodystrophy - mutation analysis provides further evidence of genotype-phenotype correlation. *Clin Genet.* (2008) 74:349-57.
- ⁴⁸ Li ZG, Waye JS, Chang PL. Diagnosis of arylsulfatase A deficiency. *Am J Med Genet.* (1992) 43:976-82.
- ⁴⁹ Hagberg B. Clinical symptoms, signs and tests in metachromatic leukodystrophie in brain lipids and lipoproteins, and the leukodystrophies. Eds. J. Folch-Pi and H. Bau. Elsevier, Amsterdam-London-New York 1963.
- ⁵⁰ Gieselmann V, Franken S, Klein D, Mansson JE, Sandhoff R, Lullmann Rauch R, Hartmann D, Saravanan VP, De Deyn PP, D'Hooge R, van der Linden AM, Schaeren-Wiemers N. Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation. *Acta Paediatr Suppl.* (2003) 92:74-9.
- ⁵¹ Haberlandt E, Scholl-Bürgi S, Neuberger J, Felber S, Gotwald T, Sauter R, Rostasy K, Karall D, Korinthenberg R. Peripheral neuropathy as the sole initial finding in three children with infantile metachromatic leukodystrophy. *Eur J Paediatr Neurol.* (2009) 13:257-60.
- ⁵² Balslev T, Cortez MA, Blaser SI, Haslam RH. Recurrent seizures in metachromatic leukodystrophy. *Pediatr Neurol.* (1997) 17:150-4.

-
- ⁵³ Galbraith DA, Gordon BA, Feleki V, Gordon N, Cooper AJ. Metachromatic leukodystrophy (MLD) in hospitalized adult schizophrenic patients resistant to drug treatment. *Can J Psychiatry.* (1989) 34:299-302.
- ⁵⁴ Rauschka H, Colsch B, Baumann N, Wevers R, Schmidbauer M, Krammer M, Turpin JC, Lefevre M, Olivier C, Tardieu S, Krivit W, Moser H, Moser A, Gieselmann V, Zalc B, Cox T, Reuner U, Tylki-Szymanska A, Aboul-Enein F, LeGuern E, Bernheimer H, Berger J. Late-onset metachromatic leukodystrophy: genotype strongly influences phenotype. *Neurology.* (2006) 67:859-63.
- ⁵⁵ Kohlschütter A. Clinical course of GM1 gangliosidoses. *Neuropediatrics.* (1984) 15:71-3.
- ⁵⁶ Grossman H, Danes BS. Neurovisceral storage disease: features and mode of inheritance. *Am. J. Roentgen.* (1968) 103:149-153.
- ⁵⁷ Singer HS, Schafer IA. Clinical and enzymatic variations in Gm-1 generalized gangliosidosis. *Am. J. Hum. Genet.* (1972) 24:454-463.
- ⁵⁸ Benson PF, Babarik A, Brown SP, Mann TP. GM1-generalized gangliosidosis variant with cardiomegaly. *Postgrad. Med. J.* (1976) 52:159-165.
- ⁵⁹ Derry DM, Fawcett JS, Andermann F, Wolfe LS. Late infantile systemic lipidosis (major monosialogangliosidosis; delineation of two types). *Neurology* (1968)18: 340-347.
- ⁶⁰ Nardocci N, Bertagnolio B, Rumi V, Combi M, Bardelli P, Angelini L. Chronic GM1 gangliosidosis presenting as dystonia: clinical and biochemical studies in a new case. *Neuropediatrics.* (1993) 24:164-6.
- ⁶¹ Koto A, Horwitz AL, Suzuki K, Tiffany CW, Suzuki K. The Morquio syndrome: neuropathology and biochemistry. *Ann Neurol.* (1978) 4:26-36.
- ⁶² Goebel HH. Morphology of the gangliosidoses. *Neuropediatrics.* (1984) 15:97-106.
- ⁶³ Sandhoff K, Christomanou H. Biochemistry and genetics of gangliosidoses. *Hum Genet.* (1979) 50:107-43.
- ⁶⁴ D'Agrosa RM, Hubbes M, Zhang S, Shankaran R, Callahan JW. Characteristics of the beta-galactosidase-carboxypeptidase complex in GM1-gangliosidosis and beta-galactosialidosis fibroblasts. *Biochem J.* (1992) 285:833-8.
- ⁶⁵ Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* (1999) 281:249-54.
- ⁶⁶ Chen B, Rigat B, Curry C, Mahuran DJ. Structure of the GM2A gene: identification of an exon 2 nonsense mutation and a naturally occurring transcript with an in-frame deletion of exon 2. *Am J Hum Genet.* (1999) 65:77-87.
- ⁶⁷ Mahuran DJ. Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses. *Biochim Biophys Acta.* (1999)1455:105-38.

-
- ⁶⁸ Volk BW, Schneck L, Adachi M. Clinic, pathology and biochemistry of Tay Sachs disease. In: Vinken PJ, Bruyn G (editors). *Leucodystrophies and poliodystrophies. Handbook of clinical neurology.* American Elsevier: New York. (1970) 10:385-426.
- ⁶⁹ Neudorfer O, Pastores GM, Zeng BJ, Gianutsos J, Zaroff CM, Kolodny EH. Late-onset Tay-Sachs disease: phenotypic characterization and genotypic correlations in 21 affected patients. *Genet Med.* (2005) 7: 119–23.
- ⁷⁰ Structure of seven oligosaccharides excreted in the urine of a patient with Sandhoff's disease (GM2 gangliosidosis-variant O). Strecker, G., Herlant-Peers, M.C., Fournet, B., Montreul, J. *Eur. J. Biochem.* (1977) 81: 165-171.
- ⁷¹ Barkovich A *Pediatric Neuroimaging.* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 4ed. (2005)976
- ⁷² Kaback M, Lim-Steele J, Dabholkar D, Brown D, Levy N, Zeiger K. Tay-Sachs disease-carrier screening, prenatal diagnosis, and the molecular era. An international perspective, 1970 to 1993. The International TSD Data Collection Network. *JAMA.* (1993) 270: 2307–15.
- ⁷³ Von Specht BU, Geiger B, Arnon R, Passwell J, Keren G, Goldman B, Padeh B. *Neurology.* Enzyme replacement in Tay-Sachs disease. (1979) 29:848-54.
- ⁷⁴ Kasperzyk JL, d'Azzo A, Platt FM, Alroy J, Seyfried TN. Substrate reduction reduces gangliosides in postnatal cerebrum-brainstem and cerebellum in GM1 gangliosidosis mice. *J Lipid Res.* (2005) 46:744-51.
- ⁷⁵ Eto Y, Ohashi T. Gene therapy/ Cell therapy for lysosomal storage disease. *J Inherit Metab Dis.* (2000) 23: 293-298
- ⁷⁶ Krivit W, Lockman LA, Watkins PA, Hirsch J, Shapiro EG. The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome. *J Inherit Metab Dis.* (1995) 18:398-412.
- ⁷⁷ Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant.* (2002) 30:215-22.
- ⁷⁸ Enquist IB, Nilsson E, Månsson JE, Ehinger M, Richter J, Karlsson S. Successful low-risk hematopoietic cell therapy in a mouse model of type 1 Gaucher disease. *Stem Cells.* (2009) 27:744-52.
- ⁷⁹ Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* (1973) 52:456–467.
- ⁸⁰ Kwan MD, Slater BJ, Wan DC, Longaker MT. Cell-based therapies for skeletal regenerative medicine. *Hum Mol Genet.* (2008) 17:93-8.
- ⁸¹ Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009 Mar 31.

-
- ⁸² Dill T, Schächinger V, Rolf A, Möllmann S, Thiele H, Tillmanns H, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM, Hamm C. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J.* (2009) 157:541–547.
- ⁸³ Furlani D, Li W, Pittermann E, Klopsch C, Wang L, Knopp A, Jungebluth P, Thedinga E, Havenstein C, Westien I, Ugurlucan M, Li RK, Ma N, Steinhoff G. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. *Cell Transplant.* 2009;18(3):319-31.
- ⁸⁴ Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O., Developmental Committee of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* (2008) 371:1579–1586.
- ⁸⁵ Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JN, Alwayn IP, Weimar W, Hoogduijn MJ. Donor-derived mesenchymal stem cells suppress alloreactivity of kidney transplant patients. *Transplantation.* (2009) 87:896–906.
- ⁸⁶ Bieback K, Kern S, Kocaömer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng.* (2008) 18:71-6.
- ⁸⁷ Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal.* (2009) 20:7-6.
- ⁸⁸ Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood.* (2003) 101:2999-3001.
- ⁸⁹ Biffi A, Capotondo A, Fasano S, del Carro U, Marchesini S, Azuma H, Malaguti MC, Amadio S, Brambilla R, Grompe M, Bordignon C, Quattrini A, Naldini L. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest.* (2006) 116:3070-82.
- ⁹⁰ Majolino I, Marceno R, Pecoraro G, Scime R, Vasta S, Liberti G, Rizzo A, Indovina A, Caronia F. Autologous stem cell transplantation in amyloidosis AL. *Bone Marrow Transplant.* (1993) 11:85.
- ⁹¹ Hua CT, Hopwood JJ, Carlsson SR, Harris RJ, Meikle PJ. Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clinical Chemistry.* (1998) 44:2094-2102.
- ⁹² Blood to brain to the rescue. *J Clin Invest.* (2004) 113:1108-10, Commentary 113:1118-29.

-
- ⁹³ Capotondo A, Cesani M, Pepe S, Fasano S, Gregori S, Tononi L, Veneri MA, Brambilla R, Quattrini A, Ballabio A, Cosma MP, Naldini L, Biffi A. Safety of arylsulfatase A overexpression for gene therapy of metachromatic leukodystrophy. *Hum Gene Ther.* (2007) 18:821-36.
- ⁹⁴ Biffi A, Capotondo A, Fasano S, del Carro U, Marchesini S, Azuma H, Malaguti MC, Amadio S, Brambilla R, Grompe M, Bordignon C, Quattrini A, Naldini L. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J Clin Invest.* (2006) 116:3070-82.
- ⁹⁵ Passini MA, Lee EB, Heuer GG, Wolfe JH. Distribution of a lysosomal enzyme in the adult brain by axonal transport and by cells of the rostral migratory stream. *J Neurosci.* (2002) 22:6437-46.

DANKSAGUNG

Ich danke

PD Dr. Ingo Müller, meinem Arbeitsgruppenleiter,
den Arbeitsgruppen Müller, Holzer und Kerst,
den Mitarbeitern des neurometabolischen Labors Johanna Backes und
Dr. rer. net. Birgit Kustermann,
Heike Runge,
Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gernot Bruchelt,
Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger,
Herrn Dr. Kuci,
dem Graduiertenkolleg "Zellbiologische Mechanismen immunassoziierter
Prozesse" GK 794,
meinen Eltern,
RGC, 'd fiinschte lyebi won y in mim läbe kennegleert ha'.

LEBENS LAUF

Name	Alexandra Staiber
Geburtstag	25. Juni 1980
Geburtsort	Bad Friedrichshall
Eltern	Carola Staiber, Cynergistin Karl Staiber, Diplom-Kaufmann
Geschwister	Christina Staiber *1982 Maximilian Staiber *1996

SCHULAU SBILDUNG

1986 – 1988	Grundschule Bergen-Enkheim
1988 – 1990	Grundschule Hoheneck
1990 – 1999	Mörrike-Gymnasium Ludwigsburg
06/1999	Abitur

STUDIUM

03/2000 – 11/2006	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
10/2004	Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Zellbiologische Mechanismen“, Tübingen
14.11.2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Ostfildern-Ruit, Approbation

BERUF

02/2007 – 06/2009	Beginn der Facharztausbildung in Liestal (CH), Kantonale Psychiatrische Klinik
11/2009	Psychiatrischer Dienst für Abhängigkeits-erkrankungen Reinach (CH)