



Hämatopoetische Stammzelltransplantation:

Gewinnung, Präparation und klinischer Einsatz

16

Dr. med. M. Wiesneth *

J. Burkhart **

Dr. rer. nat. T. Meyer **

Prof. Dr. med. H. Schrezenmeier *

Stammzellen:

Definition und Stammzelltypen

Als Stammzellen werden undifferenzierte Zellen bezeichnet, die sich durch folgende Eigenschaften auszeichnen: unbeschränkte Selbsterneuerung (Teilung ohne Differenzierung) sowie Differenzierung der Tochterzellen zu spezialisierten Funktionszellen (1,2). Dies wird durch asymmetrische Teilung in zwei unterschiedliche Tochterzellen erreicht. (1,2)

Auf der Basis ihrer Differenzierungsfähigkeit wird zwischen totipotenten, pluripotenten und multipotenten Stammzellen unterschieden. Befruchtete Eizellen, sowie die Tochterzellen der ersten Teilungsstadien, sind sogenannte **totipotente** Stammzellen, d. h. Zellen mit unbeschränktem Differenzierungspotential, die alle Zellen eines Organismus bilden können. Nach weiteren Zellteilungen bildet sich die Blastozyste, die in ihrem Innern eine Zellansammlung (icm, inner cell mass) mit den embryonalen Stammzellen enthält (3). Diese Stammzellen sind **pluripotent** und können sich zu allen Gewebearten, allerdings nicht zu einem kompletten Fötus bzw. zu Keimzellen entwickeln (3). Danach differenzieren sich die embryonalen

Stammzellen zu den drei Keimblättern: dem Ektoderm, das die Zellen der Haut und des Nervensystems bildet, dem Mesoderm, das u. a. Knochen und Muskulatur bildet und dem Endoderm, das die Zellen des Darms, sowie von inneren Organen wie Leber und Lunge, bildet. In diesen Keimblättern existieren **multipotente** Stammzellen, die in ihrem Differenzierungspotential in der Regel auf ihre jeweiligen Gewebe beschränkt sind. Ihre physiologische Funktion im erwachsenen Organismus besteht in der Regeneration der einzelnen Gewebesysteme.

Adulte Stammzellen

Die im erwachsenen Organismus vorhandenen Stammzellen sind sogenannte adulte, gewebespezifische Stammzellen, die im Vergleich zu den embryonalen Stammzellen ein vermindertes Proliferations- und Differenzierungspotential besitzen (2). Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die in einem ansonsten differenzierten Gewebe oder Organ vorkommen. Sie wurden in einer Vielzahl von Organen und Geweben nachgewiesen, z. B. in Knochenmark, Gehirn, Epidermis, Blut, Leber, Haut, Auge, Darm, Bauchspeicheldrüse, Herz- und Skelettmus-

* Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm und Abt. Transfusionsmedizin, Universität Ulm

** Institut für Transfusionsmedizin München BRK-Blutspendedienst



keln, und es wird vermutet, dass sie in den meisten, wenn nicht sogar in allen adulten Geweben vorkommen.

Einen gewaltigen Aufschwung hat das Feld der Stammzellforschung vor etwa vier Jahren erhalten, als Veröffentlichungen nahe legten, dass sich adulte Stammzellen auch in einem ausgewachsenen Organismus in verschiedene Zelltypen und somit auch in Zellen eines anderen Gewebetyps differenzieren können (Transdifferenzierung) (4-6). Bis dahin schien die dafür notwendige hohe Plastizität, das *Differenzierungskriterium pluripotenter Stammzellen*, den embryonalen Stammzellen vorbehalten. (Auf die Transdifferenzierung, insbesondere von hämatopoetischen Stammzellen, werden wir in einem zweiten Beitrag zu Stammzellen in einer der nächsten Ausgaben von „hämotherapie“ eingehen.)

Neben der besseren Verfügbarkeit von adulten Stammzellen haben diese im Vergleich zu embryonalen Stammzellen den Vorteil, dass die Forschung an ihnen nicht rechtlich oder ethisch belastet ist. Folgende Stammzellen wurden bisher näher untersucht: hämatopoetische Stammzellen, mesenchymale Stammzellen, Leber-Stammzellen, Muskel-Stamm-

zellen und neuronale Stammzellen. Von diesen sind hämatopoetische Stammzellen am besten charakterisiert (4,7). Man findet sie hauptsächlich im Knochenmark aber auch im peripheren Blut, Nabelschnurblut und der Plazenta sowie in der fötalen Leber und der Milz.

Hämatopoetische Stammzellen sind, wie der Name sagt, die blutbildenden Stammzellen. Aus ihnen bilden sich über weitere, zunehmend spezialisierte Vorläuferzellen alle Blutzellen wie Erythrozyten, Leukozyten (inklusive Immunzellen) sowie Thrombozyten. Da reife Blutzellen nur eine begrenzte und zum Teil recht kurze Lebensdauer haben, müssen sie ständig erneuert werden. Dies erfordert eine hohe Proliferationsrate der aus den hämatopoetischen Stammzellen hervorgehenden Vorläuferzellen. Selbst unter Ruhebedingungen findet eine Neubildung von etwa 10^{11} bis 10^{12} (entsprechend etwa 1 kg) Blutzellen pro Tag statt. Diese Rate wird noch deutlich gesteigert, z. B. bei Blutverlust oder Infektionen.

Charakterisierung hämatopoetischer Stammzellen

Bisher ist es nicht möglich, Stammzellen morphologisch eindeutig zu

erkennen und zu charakterisieren. Durch Kombination verschiedener immunphänotypischer Merkmale können innerhalb der Progenitorzellpopulation die eigentlichen Stammzellen stark eingegrenzt werden (8). Es gibt eine Reihe von Oberflächenantigenen, welche mit der Stammzeleigenschaft korrelieren: Hierzu gehören die Antigene CD34, CD133 und Rezeptoren stammzellwirksamer hämatopoetischer Wachstumsfaktoren wie KDR (flk-1) (= Rezeptor für vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor; VEGF), CD117 (= Rezeptor für Stammzellfaktor) und flt-3 (= Rezeptor für flt-3 Ligand). Umgekehrt zeichnen sich Stammzellen durch das Fehlen von Antigenen aus, welche eine Differenzierung in die verschiedenen Linien der Lymphohämatopoese anzeigen: z. B. CD10 für Lymphopoese, CD33 für Myelopoese, CD71 für Erythropoese, CD13 für Granulopoese oder CD41 für Megakaryopoese. Durch kombinierte Anwendung solcher Marker kann ein spezifisches immunphänotypisches Profil hämatopoetischer Vorläuferzellen erstellt werden, welches auch die Basis für immunologische Anreicherungsverfahren ist. Der Goldstandard in der Stammzellcharakterisierung sind jedoch weiterhin funktionelle Assays, welche die Pluripotenz und die hämatopoetische Repopulationsfähigkeit bele-

gen (9, 10). Darüberhinaus gibt es Ansätze, Stammzellen auf der Basis zellphysiologischer Merkmale (z. B. niedriges mitochondriales Membranpotential zu charakterisieren (siehe Titelseite)). In der klinischen Anwendung hat sich die Markierung des CD34-Antigens (eventuell in Kombination mit CD133 und fehlende Expression von Zell-Liniendifferenzierungs-Antigenen) als einfach und schnell bestimmbarer Surrogat-Parameter zur „Stammzell“-Quantifizierung durchgesetzt (11). Allerdings sind nur 0.01-0.001 % der CD34⁺-Zellen „echte“ hämatopoetische Stammzellen im Sinne von Pluripotenz und Rekonstitutionspotential. Ebenso sind die klonogenen in-vitro Assays für determinierte Progenitorzellen der Erythropoese (Burst-forming units;

BFU-E) oder der Granulopoese (Colony-forming units granulocytes/monocytes, CFU-GM) nur Surrogat-Marker für hämatopoetische Stammzeleigenschaften (12).

Abbildung 1 zeigt das lichtmikroskopische Erscheinungsbild CD34⁺ selektierter Zellen.

Stammzellquellen für die hämatopoetische Stammzelltransplantation

Als Stammzellquellen für hämatopoetische Stammzelltransplantationen werden derzeit verwendet:

- › Knochenmark
- › Peripheres Blut nach Stammzellmobilisation
- › Nabelschnurblut

Tabelle 1 fasst einige Eigenschaften dieser Stammzellquellen zusammen.

Fetale Leberstammzellen wurden nur bei wenigen Transplantationen beim Menschen eingesetzt und führten nur zu vorübergehender hämatopoetischer Rekonstitution.

Die Frequenz von hämatopoetischen Stammzellen wurde in einer

vergleichenden funktionellen Untersuchung mit 1 pro 3 x 10⁶ Zellen im Knochenmark, 1 pro 6 x 10⁶ Zellen in G-CSF-mobilisierten, unmanipulierten Blutstammzellpräparaten und 1 pro 9.3 x 10⁵ Zellen im Nabelschnurblut ermittelt (13).

In diesem Beitrag wird insbesondere auf die peripheren Blutstammzellen (PBSZ) eingegangen. Die Nabelschnurbluttransplantation wird in einer späteren Ausgabe von „hämotherapie“ schwerpunktmäßig behandelt.

Mechanismen der Stammzellmobilisation

Die Emigration hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark in das zirkulierende Blut bezeichnet man als „Mobilisation“. Die Chemotherapie- und Wachstumsfaktor-induzierte Mobilisation ist eine quantitative Verstärkung eines Prozesses, welcher auch bei anderen „Stress“-Signalen wie Entzündung oder Gewebeschädigung vorkommt. Erst in den letzten Jahren gelang die teilweise Aufklärung der komplexen Interaktionen zwischen hämatopoetischen Vorläuferzellen, mesenchymalen Zellen und extrazellulärer



Abbildung 1
Lichtmikroskopische Aufnahme von CD34⁺ positiv-selektierten Blutstammzellen

Einige Charakteristika verschiedener Stammzellquellen für hämatopoetische Stammzelltransplantationen

Knochenmark

- › multiple Aspiration aus Beckenkamm
- › Vollnarkose
- › limitierte Stammzellzahl

G-CSF-modulierte Blutstammzellen

- › Gewinnung einfach
- › keine Vollnarkose erforderlich
- › Nebenwirkungen von G-CSF (siehe *Abbildung 3*)
- › hohe Stammzellzahl erreichbar
- › rasche Regeneration nach Transplantation
- › geringe Tumorzellkontamination (bei autologer Transplantation)

Nabelschnurblut

- › Gewinnung einfach und ungefährlich
- › gewonnene Stammzellzahl (noch) limitierender Faktor
- › HLA-Mismatch-Transplantation möglich

Tabelle 1

Matrix im Knochenmark und neutrophilen Granulozyten (14, 15). Wesentliche Interaktionspartner sind hierbei Adhäsionsmoleküle, Chemokine (z. B. Stroma-derived factor 1 (SDF-1), Interleukin-8 (IL-8) und proteolytische Enzyme (z. B. Elastase, Cathepsin G und

Matrix-Metalloproteinasen). *Abbildung 2* zeigt in schematischer Weise über welche membranständigen Strukturen die hämatopoetischen Zellen mit entsprechenden Liganden bzw. Rezeptoren in der Umgebung interagieren. Proteolytische Spaltung dieser Bindungspartner führt zur Mobilisation. SDF-1, ein Chemokin, welches durch Stromazellen, vor allem Osteoblasten, im Knochenmark produziert wird, ist das potenteste Chemotaxin für hämatopoetische Progenitorzellen. SDF-1 bindet an den Chemokinrezeptor CXCR4 auf hämatopoetischen Stammzellen. Elastase und Cathepsin G, welche aus neutrophilen Granulozyten durch G-CSF- oder IL-8-Stimulation freigesetzt werden, und Metalloproteinasen können den N-terminalen Anteil von SDF-1 und Teile des CXCR4-Rezeptors abspalten und damit die SDF-vermittelte Signaltransduktion und die gerichtete Migration von Stammzellen beeinflussen.

Weitere durch die proteolytische Spaltung von Bindungspartnern beeinflusste Interaktionen sind neben anderen die Bindung über den c-kit-Rezeptor an membranständigen Stammzellfaktor (SCF) oder die Bindung über VLA-4 an das „Vascular Cell Ad-

hesion Molecule“ (VCAM) (siehe *Abbildung 2*).

Ein gemeinsamer Mechanismus ganz unterschiedlicher mobilisierender Substanzen ist die Freisetzung von Proteasen, welche die Rezeptor-Liganden-Interaktion zwischen hämatopoetischen Progenitorzellen und ihrer Umgebung beeinflussen. Hierbei wirken verschiedene Proteasen mit unterschiedlicher Substratspezifität zusammen (14, 16).

Stammzellgewinnung: Mobilisation

Die Substanzgruppen, welche in das Homing hämatopoetischer Zellen eingreifen und Blutstammzellen mobilisieren können, sind in der *Tabelle 2* zusammengefasst (15). Die Kombination verschiedener mobilisierender Substanzen kann dabei synergistisch wirken, wobei insbesondere die Sequenz aus myelosuppressiver Chemotherapie und anschließender Gabe von myeloischen Wachstumsfaktoren sehr effektiv ist.

Die Mobilisation von *autologen* peripheren Blutstammzellen erfolgt deshalb in der Regel durch

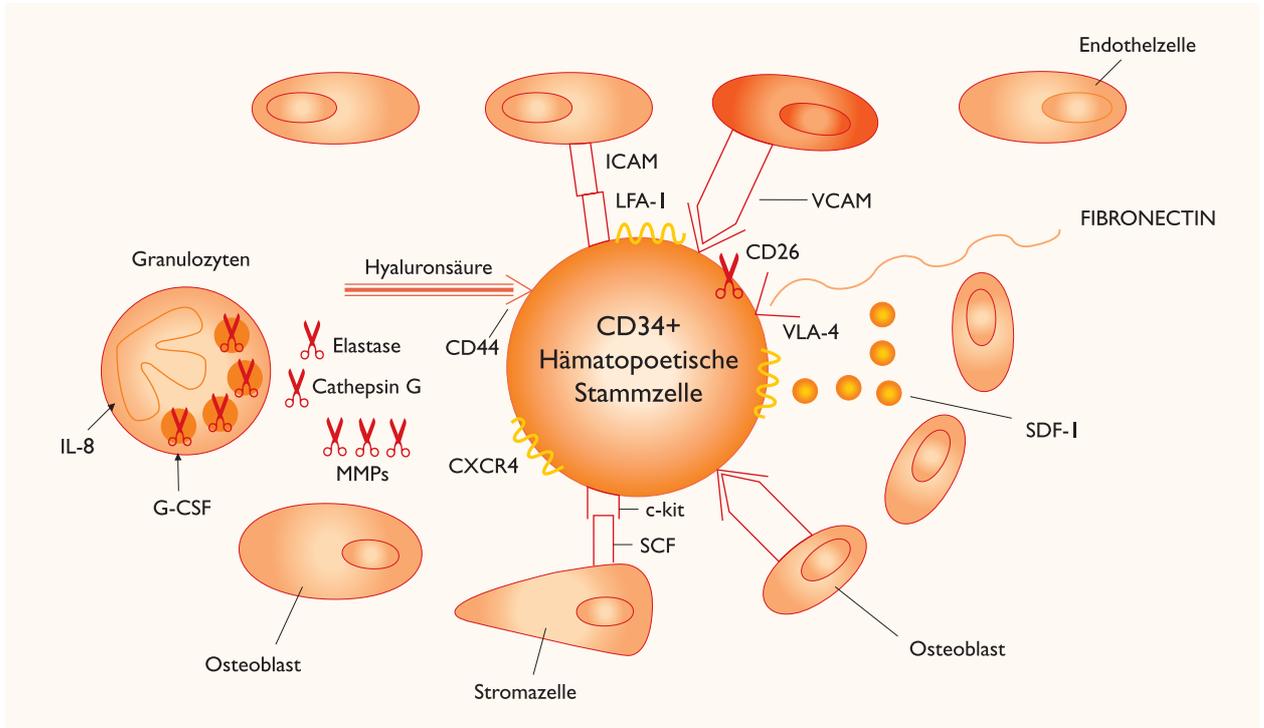


Abbildung 2

Schematische Darstellung der Interaktionen, welche das „Homing“ und die Mobilisierung hämatopoetischer Progenitorzellen beeinflussen.

Die Stammzellen binden an benachbarte Osteoblasten, Stromazellen, Endothelzellen oder extrazelluläre Matrix (z. B. Hyaluronsäure, Fibronectin) durch Interaktion zwischen membranständigem Stammzellfaktor (SCF) und seinem Rezeptor (c-kit), dem $\beta 1$ -Integrin VLA-4 und „Vascular cellular adhesion molecule“ (VCAM), dem $\beta 2$ -Integrin Lymphozyten-Funktions-assoziiertem Antigen I (LFA-1) und „Inter cellular adhesion molecule“ (ICAM), CD44 und Hyaluronsäure, VLA-4 und Fibronectin. Ein potentes Chemoattraktant für hämatopoetische Stammzellen ist der „Stroma-derived factor I“ (SDF-I), welcher vor allem von Osteoblasten produziert wird und an den Chemokinrezeptor CXCR4 auf Stammzellen bindet. Die dargestellten Interaktionen können moduliert werden durch proteolytische Spaltung. Entsprechende Enzyme werden aus Granulozyten nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren (z. B. G-CSF) oder Chemokinen (z. B. IL-8) freigesetzt (Elastase, Cathepsin G, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)) oder werden als membranständige Dipeptidylpeptidasen (CD26) exprimiert.

Chemotherapie und nachfolgende s.c.-Gabe von G-CSF. Die Standarddosis in dieser Indikation ist 5 μg G-CSF/kg KG und Tag. Damit ist eine Steigerung der Zahl zirkulierender $\text{CD}34^+$ -Zellen auf im Mittel etwa 70/ μl (bei Frauen) und 85/ μl (bei Männern) erreichbar (**Tabelle 3**). Es besteht jedoch eine große interindividuelle Variabilität (**17, 18**). Der Ertrag einer Stammzellapherese ist abhängig von Alter, Geschlecht, Diagnose, Stadium der

Erkrankung, Art und Anzahl, sowie Effekt der vorangegangenen Chemotherapie-Zyklen (**17, 19-23**). Bei hämatologischen Erkrankungen mit massivem Knochenmarkbefall kommt es in der Regel zu einem geringeren und verzögerten Stammzellenanstieg im peripheren Blut. Frauen und ältere Personen zeigen ebenfalls einen geringeren Anstieg der $\text{CD}34^+$ -Zellzahl und vereinzelt gibt es „Poor Mobilizer“, die trotz ausreichender G-CSF-Ga-

be ein ungenügendes Ansprechen mit weniger als 10 $\text{CD}34^+$ -Zellen/ μl Blut aufweisen (**24, 25**). Die Anzahl zirkulierender $\text{CD}34^+$ -Zellen im peripheren Blut vor Beginn der Mobilisation (d. h. während „steady-state“-Hämatopoese) ist ein sehr guter Prädiktor für das Ergebnis der Mobilisation durch Chemotherapie und G-CSF (**26**). Die Absolutzahl zirkulierender $\text{CD}34^+$ -Zellen vor Beginn der Apherese erlaubt wiederum eine gute Vorhersage der Zahl

an CD34⁺-Zellen im Transplantat (27-29).

Substanzen mit mobilisierender Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren:

- Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) (glykosylierte und nicht-glykosylierte Form; PEG-G-CSF)
- Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)
- Stammzellfaktor (SCF)
- Thrombopoetin (TPO)
- flt-3 ligand
- PIXY 321 (IL-3/GM-CSF-Fusionsprotein)

Interleukine:

- Interleukin-7
- Interleukin-12
- Interleukin-3

Chemokine:

- Interleukin-8
- Stroma-derived Faktor-1 (SDF-1)
- Makrophagen-inhibierendes Protein (MIP I α)

Zytostatika:

- Cyclophosphamid
- Paclitaxel
- Viele weitere Zytostatika

Heparansulfat-Proteoglykane

AMD3100

Humanes Wachstumshormon (GH)

In der frühen Phase der Stammzellmobilisation ist der Anteil unreifer Progenitorzellen innerhalb der CD34⁺-Zellen hoch. Daher sollte bei Beginn des Leukozytenanstiegs eine regelmäßige Bestimmung der CD34⁺-Zellen erfolgen, um bei Überschreiten eines Triggers von 10 - 20 zirkulierenden CD34⁺-Zellen/μl Blut frühzeitig mit der Stammzellapherese beginnen zu können (18).

Zur Gewinnung peripherer Stammzellen für die *allogene* Stammzelltransplantation erfolgt die Mobilisation routinemäßig allein mit G-CSF. In klinischen Studien schwankten die eingesetzten G-CSF-Dosierungen zwischen 5 und 16 μg/kg und Tag über 4-5 Tage (30-33). Die durch 1-3 Apheresen hiermit erreichbare CD34⁺-Zellzahl betrug in diesen Studien im Mittel 5.8-7.3 x 10⁶ CD34⁺-Zellen/kg Körpergewicht des Empfängers (30-33).

Meist wird eine Dosierung von 10 μg/kg KG eingesetzt, mit der sich in der Mehrzahl der Fälle die Zieldosis von > 4 x 10⁶ CD34⁺-Zellen pro kg KG des Empfängers mit 1-2 Apheresen erreichen lässt (Tabelle 3). Allerdings gibt es auch bei gesunden Personen so genannte

„Poor Mobilizer“, so dass in Einzelfällen eine zusätzliche Knochenmarkentnahme erforderlich sein kann, um ein ausreichendes Transplantat zu erhalten. Neue Studien sprechen für eine Verbesserung der Transplantatenergebnisse durch Steigerung der transplantierten CD34⁺-Zellen über die genannte Zieldosis. Sehr hohe Dosen können jedoch mit mehr GvHD assoziiert sein.

Bei bis zu 60 % der Spender kommt es unter der G-CSF-Gabe zu deutlichen Nebenwirkungen wie Muskel- und Knochenschmerzen, die z. T. die Gabe von Analgetika erfordern. Neben dieser Grippeähnlichen Symptomatik treten gelegentlich passagere Enzymerhöhungen im Blut (ALP, GOT, GPT, LDH) und eine leichte Milzvergrößerung sowie eine länger anhaltende mäßige Thrombozytopenie auf (34). Die pharmakologischen Effekte und unerwünschten Wirkungen von G-CSF bei der Mobilisationsbehandlung sowie deren typischer zeitlicher Verlauf sind in **Abbildung 3** zusammengefasst.

Von den anderen in **Tabelle 2** genannten biologischen Faktoren zur Stammzellmobilisation wird klinisch am ehesten noch GM-CSF verwen-

Tabelle 2



det. Im Vergleich zu G-CSF ist seine mobilisierende Wirkung jedoch geringer und die Inzidenz von Nebenwirkungen höher. Allerdings gibt es Berichte über raschere Immunrekonstitution nach Transplantation von GM-CSF-mobilisierten im Vergleich zu G-CSF-mobilisierten Stammzellen. Bei schlecht mobilisierenden Patienten kann die Kombination von GM-CSF mit G-CSF oder eine sequentielle Gabe von GM-CSF und nachfolgend G-CSF sinnvoll sein.

Stammzellfaktor (SCF) (Ancestim) und flt-3 Ligand (Mobist) haben in

Studien vor allem in Kombination mit G-CSF eine sehr gute mobilisierende Wirkung gezeigt. SCF kann allerdings in Mastzellen Histaminfreisetzung stimulieren und dadurch allergieartige Reaktionen auslösen. Derzeit sind diese Substanzen in Deutschland nicht zugelassen.

Länger wirksame Substanzen wie die pegylierte Form von G-CSF (Pegfilgrastim; Neulasta®) oder ein langwirksames Erythropoietin (Darbopoietin; Aranesp®) werden derzeit in klinischen Studien als mobilisierende Substan-

zen geprüft. Erste Erfahrungen sind positiv.

Mit AMD3100, einem reversiblen Inhibitor der Bindung von SDF-1 an CXCR4 (*siehe Abbildung 2*), wird erstmals eine rationale Therapie eingesetzt, welche auf den neuen Erkenntnissen zur Interaktion von hämatopoetischen Stammzellen mit dem Knochenmarkstroma basiert. In Tierversuchen führte AMD3100 alleine, aber insbesondere in Kombination mit G-CSF zu einer starken Stammzellmobilisation. In Phase-II-Studien zur autologen Stammzellmobilisation bei Patienten mit soliden Tumoren, Lymphomen oder Multiplem Myelom wurde gezeigt, dass die Kombination von AMD3100 mit G-CSF effektiver ist als G-CSF alleine und auch bei „Poor Mobilizern“ die Sammlung einer für die Transplantation ausreichenden Stammzellzahl ermöglicht. Weitere Studien zu dieser Substanz sind aktiviert. Bei „Poor Mobilizern“ hat sich auch eine Kombination von G-CSF mit humanem Wachstumsfaktor (rh GH) als effizient erwiesen (35).



Abbildung 3

Wirkungen und Nebenwirkungen von G-CSF in der Mobilisation von Blutstammzellen (modifiziert nach Akizuki et al., 2000 (34))

Stammzellgewinnung: Apherese

Die Stammzellapherese, d. h. die Entnahme und Gewinnung der Blutstammzellen erfolgt mit Zellseparatoren, an die die Patienten bzw. Spender über die Cubitalvenen angeschlossen werden. Bei einem kontinuierlichen Blutfluss werden die Blutstammzellen im Zentrifugenset angereichert und in einen Sammelbeutel überführt (36). Die Extraktionseffizienz moderner Geräte liegt dabei für CD34⁺-Zellen über 50 % mit einem geringen Verlust an Erythrozyten. Die prozentuale Anreicherung der CD34⁺-Zellen von 0,21 % im peripheren Blut nach G-CSF-Mobilisation auf 0,92 % im Apheresekonzentrat ist in **Abbildung 5** dargestellt. Als Antikoagulant wird ACD-A in der Regel in einem Mischungsverhältnis von 1 : 12 bis 1 : 18 zum Vollblut verwendet, so dass die Citrat-Nebenwirkungen trotz einer Separationsdauer von bis zu fünf Stunden gering sind. Bei einem mittleren Blutfluss von 40-70 ml pro Minute, der im Wesentlichen von den Venenverhältnissen abhängig ist, sollte während einer Apherese zumindest das Dreifache des Gesamtkörper-Blutvolumens prozessiert werden. Hierdurch lässt sich der Ertrag an Stammzellen erhöhen.

Aphereseparameter bei autologer und allogener Stammzellapherese

	Autolog	Allogen
	n = 551	n = 387
Sep. Blutvolumen (l)	14,0	13,2
CD34 ⁺ -Zellen (pro µl)	77*	63*
Präparat-Volumen (ml)	295	291
› Erythrozyten (ml)	13,0	15,1
› NC (10 ¹⁰)	5,1	6,2
› CD34 ⁺ (%)	1,0	0,6
› CD34 ⁺ (10 ⁸)	5,0	4,0*
Anzahl Apheresen pro Patient zum Erreichen der Zielzellzahl	\bar{x} = 2,3 Apheresen	\bar{x} = 1,6 Apheresen

* p < 0,001 signifikanter Unterschied zwischen ♀ und ♂
 NC: Gesamtzahl kernhaltiger Zellen
 Daten: Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm

Bei ca. 75 % der Männer und bei ca. 50 % der Frauen reicht eine Apherese, um für eine allogene Transplantation die Zielmenge von > 4 x 10⁶ CD34-positiven Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers zu erhalten (**siehe Tabelle 3**). Die Nebenwirkungen und Risiken der Stammzellapherese entsprechen denen der Routineaphereseverfahren zur Gewinnung von Thrombozyten, Granulozyten oder mononuklearen Zellen, wobei im Vordergrund Kreislaufprobleme und Citratreaktionen stehen. Insgesamt stellen die Stammzellmobilisation und Apherese ein sehr sicheres

Verfahren dar. Nach drei bis sechs Monaten kommt es zu einer kompletten Normalisierung der peripheren Blutbildwerte, so dass eine Wiederholung der Stammzellspende möglich ist (37).

Stammzellgewinnung: Präparation

Zur Erhöhung der Empfänger-Sicherheit und Verbesserung des Transplantationsergebnisses ist bei bestimmten Spender-Empfänger-Konstellationen eine Depletion von B- oder T-Zellen oder in der

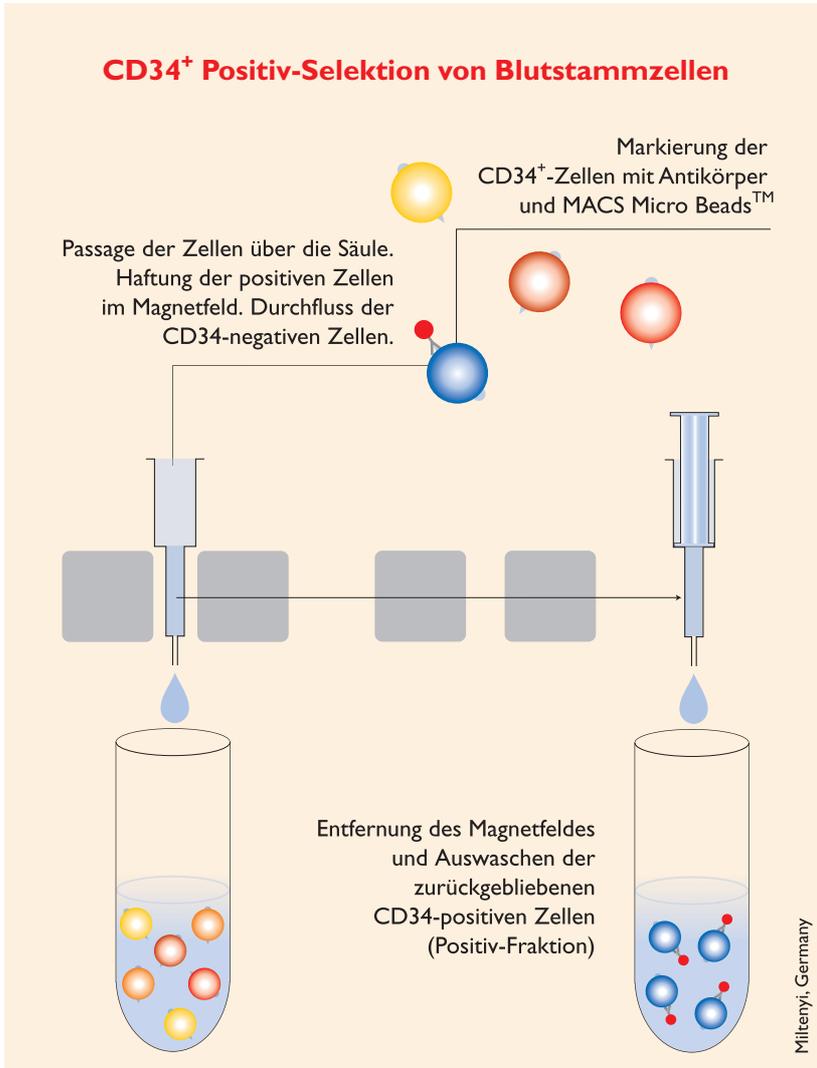


Abbildung 4a

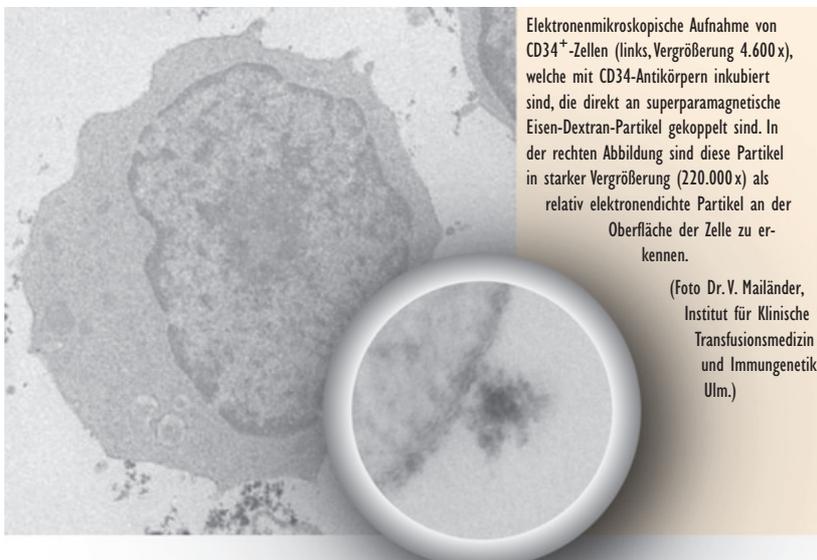


Abbildung 4b
Selektion von Zellen mit immunmagnetischen Beads

autologen Situation die Depletion möglicherweise das Transplantat kontaminierender Tumorzellen erforderlich. Hierzu wird sehr häufig ein inzwischen standardisiertes Verfahren zur Immunmagnetseparation eingesetzt, bei dem CD34-positive Zellen hoch selektiv angereichert und somit kontaminierenden Zellen reduziert werden. Das Schema in **Abbildung 4a** stellt das Verfahren der Immunmagnetseparation dar, bei dem Antikörper gekoppelte Magnetpartikel die Zellen markieren und in einem Magnetfeld anreichern. **Abbildung 4b** zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme immunmagnetischer Beads an der Oberfläche einer Zelle. Nach Entfernen des Magnetfeldes werden die markierten positiven Zellen (Positiv-Fraktion) in ein separates Gefäß überführt. In der durchflusszytometrischen Kontrolle der Immunfluoreszenz zeigt sich sehr deutlich die Anreicherung der CD34⁺-Zellen durch die Apherese auf nahezu 1 % und durch das Immunmagnetverfahren auf eine Reinheit von über 99 % (**Abbildung 5**). Gleichzeitig werden die kontaminierenden CD3-positiven T-Zellen, die im Ausgangspräparat ca. 45 % betragen, auf deutlich unter 1 % im Endprodukt reduziert (**Abbildung 5**). Die alloreaktiven T-Zellen, die eine

„Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion“ (Graft-versus-Host Disease; GvHD) nach Transplantation auslösen können, werden somit weitgehend entfernt, so dass dieses Verfahren auch eine effektive Maßnahme bei HLA-nicht-identen Transplantationen zur Vermeidung einer schweren GvHD darstellt (38).

Diese Immunmagnetverfahren mit monoklonalen Antikörpern können auch zur Anreicherung und Selektion spezifischer, immunkompetenter Zellen wie dendritischer Zellen, natürlicher Killerzellen oder regulatorischer T-Zellen verwendet werden, um durch gezielten Einsatz solcher Subpopulationen bei Virus- oder Tumorerkrankungen die Transplantationsergebnisse weiter zu verbessern.

Kryokonservierung hämatopoetischer Stammzellen

Eine monate- oder jahrelange Lagerung von Blutzellen ist nur durch Kryokonservierung möglich. In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde entdeckt, dass durch die Zugabe von Glycerin bei Erythrozyten die Schäden durch das Einfrieren vermieden

werden können. Auch andere Zelltypen werden durch Glycerin beim Einfrieren geschützt. So konnten eingefrorene und aufgetaute Knochenmarkstammzellen 1955 erst-

mals erfolgreich im Tierexperiment genutzt werden. Seit 1961 wird Dimethylsulfoxid (DMSO) als Standard zum Kryokonservieren von Stammzellen aus Knochen-

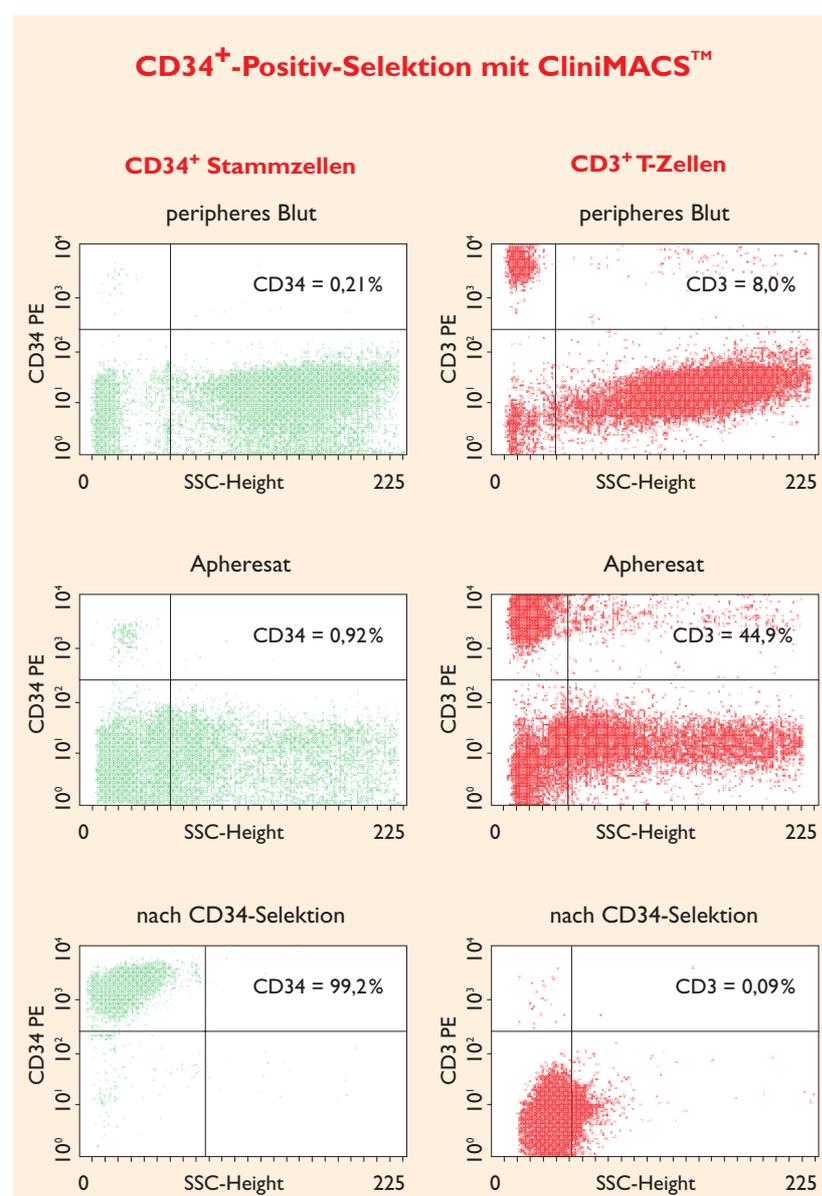


Abbildung 5

Gewinnung und Anreicherung von CD34⁺-Zellen für die Stammzell-Transplantation. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen den Anteil CD34-positiver Progenitorzellen (linke Reihe) im peripheren Blut des Spenders, im Apheresepreparat und nach immunmagnetischer Anreicherung mit einer Reinheit > 99%. Die rechte Reihe zeigt die parallele Abnahme der CD3⁺ T-Lymphozyten mit einem residuellen Anteil < 0,1%.



mark und inzwischen auch von peripheren Blutstammzellen eingesetzt.

Bei einem langsamen Absenken der Temperatur unter den Gefrierpunkt, kommt es zuerst zu einem Ausfrieren des extrazellulären Wassers und zur Aufkonzentrierung der extrazellulären Elektrolyte, die nicht mit einfrieren (39). Dies führt zu einem osmotischen Ungleichgewicht und damit zu einer Schrumpfung der Zellen.

Bei einer sehr schnellen Temperaturabsenkung kommt es durch den hohen Restwassergehalt in den Zellen zu einer intrazellulären Eiskristallbildung, die die Zellmembran zerstören kann.

Mit der Zugabe des Kryokonservierungsmittels wie zum Beispiel DMSO, das durch die Zellmembran in die Zelle eindringt, sowie einer kontrollierten Temperaturabsenkung, wie sie mit einer computergesteuerten Einfrieranlage gewährleistet wird, können diese schädigenden Einflüsse reduziert werden. Die Temperaturen werden so weit herabgesenkt, dass es zu einer glasartigen Erstarrung im Zellinneren ohne Eiskristallbildung kommt und nur noch wenige Zellen beim Einfrieren zerstört werden.



Abbildung 6 

Die Lagerung der eingefrorenen Stammzellen findet in speziellen Lagerkassetten in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff statt.

Das Kryokonservierungsmittel (7,5 - 10 % DMSO oder 5 % DMSO plus 6 % HES) wird bei einer Temperatur zwischen 0 °C und 4 °C zugegeben, da die DMSO-Lösung bei Raumtemperatur zytotoxisch ist. Die Vorverdünnung der DMSO-Gefrierschutzlösung wird mit einer Proteinlösung hergestellt, wobei entweder autologes Plasma oder Humanalbumin verwendet wird. Danach wird die Zellsuspension portioniert und in spezielle Einfrierbeutel für tiefe Temperaturen umgefüllt. Anschließend wird die vorgekühlte DMSO-Gefrierschutzlösung im gleichen Volumen zur ebenfalls gekühlten Stammzellsus-

pension schrittweise zugegeben und der Einfrierbeutel verschweißt.

Das Einfrieren erfolgt in computergesteuerten Einfrieranlagen, in denen die Temperaturabsenkung durch das Einblasen von Flüssigstickstoff durchgeführt wird. Die optimale Kühlrate der Zellsuspension liegt bei 1-4 °C/min. Um einen gleichmäßigen Einfrierverlauf zu haben, werden die Kryobbeutel in Aluminiumkassetten eingespannt, die eine gleichmäßige Schichtdicke während des Einfriervorganges gewährleisten und anschließend als Schutzhülle während der Lagerung genutzt werden können.

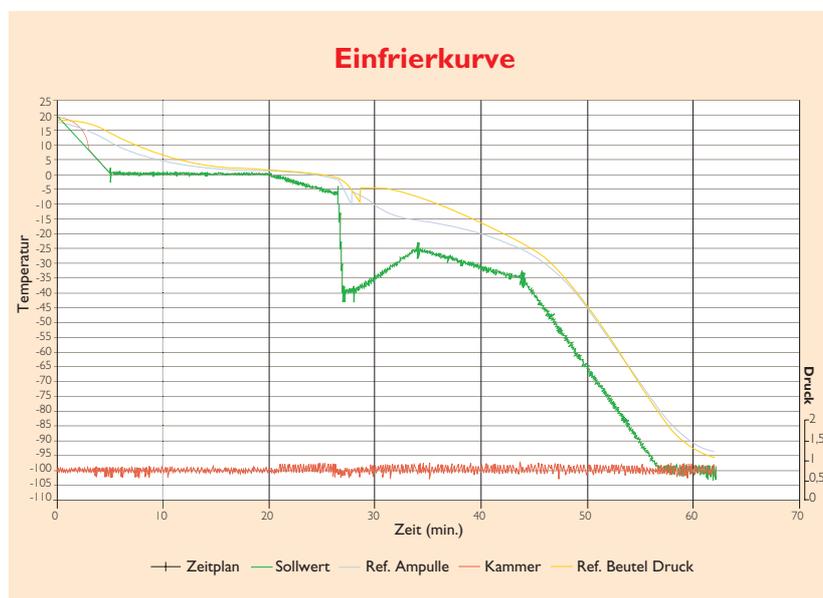


Abbildung 7

Temperatur-Zeit-Verlauf beim Einfrieren eines Stammzellpräparates mit Angabe der Kammertemperatur, Beuteltemperatur und Temperatur des Pilotröhrchens.

nen (Abbildung 6). Zur Kontrolle und Dokumentation des Einfriervorganges befindet sich in der Einfrierkammer eine Referenzprobe mit einem Temperaturfühler, der den Temperatur-Zeit-Verlauf aufzeichnet (Abbildung 7).

Die Lagerung des eingefrorenen Beutels erfolgt in der Regel in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff bei ca. $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, da es bei der Lagerung in der Flüssigphase zu Infektionen durch defekte Beutel gekommen ist. Es sind Lagerungszeiten von mehreren Jahren möglich.

Qualitätskontrolle und Auftauen

Vor und während der Verarbeitung sowie nach der Lagerung müssen mindestens folgende Untersuchungen zur Qualitätskontrolle stattfinden:

- › Testung auf Infektionserreger: Hepatitis B und C, HIV und Syphilis
- › Durchflusszytometrische Messung der Anzahl von Stammzellen mittels Oberflächenantigenen (CD34)
- › Koloniebildende Ansätze (Colony Assay, CFU-GM) zur

Erkennung der Funktionalität der eingefrorenen Zellen

- › Sterilitätstestung des Präparates mit aerober und anaerober Kultur
- › Umgebungsmonitoring im Reinraum (Abklatschpräparate, Luftkeimmessungen, Partikelmessungen) zur Überprüfung eines sterilen Verarbeitungsprozesses

Bei der letzten Probennahme werden Pilotröhrchen gefüllt, die gleichzeitig mit dem Präparat eingefroren werden. Aus diesen Pilotröhrchen können Analysen (z. B. Funktionalitätsassays) nach dem Auftauen des Materials durchgeführt werden.

Zur Transplantation wird das Stammzellpräparat in gefrorenem Zustand zum Krankenbett gebracht, wo dann das Auftauen in speziellen Auftaegeräten (z. B. mit warmwassergefüllten Gelkissen, Luftwärmetauscher) durchgeführt wird. Die aufgetaute Stammzellsuspension soll dem Patienten dann so schnell wie möglich direkt ohne Waschschrift transplantiert/transfundiert werden, wobei ein üblicher Transfusionsfilter ($170\text{ }\mu\text{m}$) verwendet wird.

Transplantierte Zellen in einer retrospektiv-randomisierten Studie zum Vergleich von Blutstammzellen (PBSZ) und Knochenmark (KM) als Stammzellquelle bei allogener Transplantation wegen malignen hämatologischen Erkrankungen

	PBSZ	KM
Kernhaltige Zellen (x 10 ⁸ /kg)	11,6	2,3
CD34 ⁺ -Zellen (x 10 ⁶ /kg)	7,3	2,4
CD3 ⁺ -Zellen (x 10 ⁶ /kg)	7,3	2,4

Alle Werte sind bezogen auf kg Empfängergewicht. CD34 ist ein Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen und CD3 ist ein Marker, welcher auf allen T-Lymphozyten vorhanden ist. Der Unterschied zwischen den Stammzellquellen ist für alle Zelltypen signifikant (p < 0,001).
(aus: Bensinger et al., 2001 (31))

Tabelle 4 ^

Rechtliche Vorgaben zur Herstellung und Anwendung von Blutstammzellpräparaten

Periphere Blutstammzellen sind Arzneimittel gemäß § 2 Abs. 1 Arzneimittelgesetz (AMG). Anforderungen an Spendeinrichtungen, die Auswahl, die Aufklärung und Einwilligung und die Vorbehandlung zur Stammzellapherese sind im Transfusionsgesetz geregelt. Weitere Vorgaben (36) zur Vorbereitung und Durchführung von autologen und allogenen Stammzellapheresen sowie zur Herstellung und Lagerung von Blutstammzellpräparaten finden sich in den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ und den „Richtlinien zur

Transplantation peripherer Blutstammzellen“ sowie den „Richtlinien für Gute Herstellungspraxis (GMP) und Herstellung und Qualitätskontrolle somatischer Zelltherapeutika“. Diese fordern neben einem Qualitätssicherungssystem u. a. höchste Hygienestandards mit Bedingungen der Reinraumklasse A in B gemäß EG-GMP-Leitfaden bei Arbeiten im offenen System wie den Selektions- und Depletionsverfahren und der Kryokonservierung.

Nach § 67 AMG ist die Gewinnung und Präparation von Blutstammzellen der zuständigen Landesbehörde anzuzeigen, welche eine Herstellungserlaubnis gemäß § 13 Abs. 1 AMG erteilt. Da es sich bei den Blutstammzellpräparaten um gerich-

tete, sogenannte Rezepturen und nicht um Fertigarzneimittel auf Vorrat handelt, ist im Gegensatz zu den Placenta-Restblut-Präparaten keine Zulassung durch die Bundesoberbehörde (PEI) erforderlich.

Blutstammzellen im Vergleich zu Knochenmark

Die zelluläre Zusammensetzung von Transplantaten aus Knochenmark unterscheidet sich signifikant von Blutstammzellpräparaten. In mehreren randomisierten Studien wurde gezeigt, dass in den Blutstammzellpräparaten die Gesamtzahl kernhaltiger Zellen etwa 4-5 Mal, die Zahl CD34-positiver Zellen etwa 2-4 Mal und die Zahl der T-Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen etwa 10 Mal so hoch ist wie in Knochenmarkstransplantaten (siehe Tabelle 4) (31).

Im Vergleich zur Knochenmarkstransplantation (KMT) regenerieren neutrophile Granulozyten und Thrombozyten nach Blutstammzelltransplantation (PBSZT) signifikant schneller (Abbildung 8). Die mediane Zeit zum Erreichen einer Neutrophilenzahl über 500/µl beträgt bei autologer PBSZT 10-15 Tage im Vergleich zu 19-26 Tagen nach autologer KMT; bei allogener

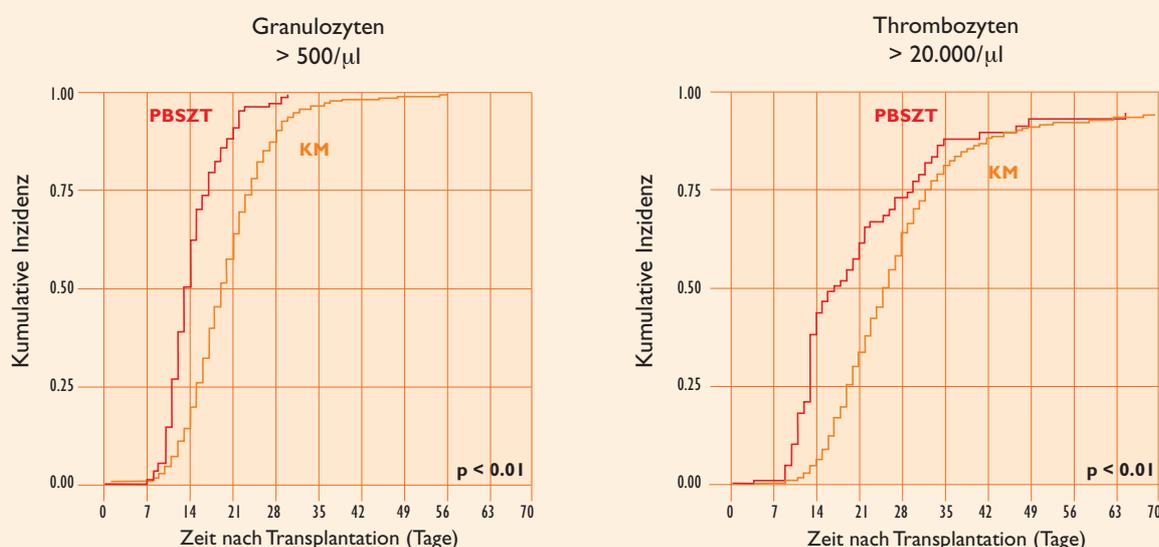
PBSCT 12-19 Tage im Vergleich zu 15-23 Tagen nach allogener KMT. Es gibt wenig vergleichende Untersuchungen zur Immunrestitution nach allogener PBSZT bzw. KMT (**Tabelle 5**). Die Reconstitution der naiven T-Helfer-Zellen (CD4⁺CD45RA⁺) und der Memory-T-Helfer-Zellen (CD4⁺CD45RO⁺) sowie der B-Lymphozyten scheint nach allogener PBSZT schneller abzulaufen als nach allogener KMT (**40**).

Aufgrund der hohen Lymphozytenzahl in Blutstammzellpräparaten bestand die Sorge, diese könnten zu einer hohen Inzidenz an schwerer GvHD führen. In den randomi-

sierten Studien trat jedoch mit einer Ausnahme keine erhöhte Inzidenz einer akuten GvHD auf. Dagegen wurde in einer Reihe von randomisierten Studien eine höhere Inzidenz an chronischer GvHD nach PBSZT im Vergleich zu KMT beobachtet. In einigen vergleichenden Studien bei Patienten mit akuter oder chronischer Leukämie bestand nach allogener KMT ein höheres Risiko für ein klinisches oder zytogenetisches Rezidiv der Grunderkrankung (**Tabelle 5**). Dies könnte auf einen verstärkten immunologischen Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (Graft-vs-Leukemia, GvL) nach PBSZT zurückzuführen sein. Vergleich-

chende Untersuchungen der Überlebenswahrscheinlichkeit nach allogener KMT bzw. PBSZT bei verschiedenen Erkrankungen zeigten ein heterogenes Bild. Bei einigen Studien bestand kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben und Krankheits-freiem Überleben nach PBSCT oder KMT. Dagegen zeigten Studien mit größerer Fallzahl eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit nach PBSCT, vor allem durch die geringere Transplantationsassoziierte Mortalität bei Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (**siehe Tabelle 5**). Ein besseres Gesamtüberleben nach allogener KMT im Vergleich zur

Die hämatopoetische Reconstitution verläuft nach Transplantation von PBSZ rascher als mit KM. Gezeigt am Beispiel allogener Geschwisterspender-Stammzelltransplantationen bei aplastischer Anämie (41)





PBSCT wurde bislang lediglich bei einer retrospektiven Analyse von Transplantationsergebnissen bei aplastischer Anämie, also einer nicht-malignen Erkrankung, gefunden (41).

Entwicklung der Stammzelltransplantation in Deutschland und Indikationen

Im letzten Jahrzehnt kam es zunächst bei der autologen Transplantation und seit etwa 1995 auch bei der allogenen Transplantation zu

einer deutlichen Zunahme des Einsatzes mobilisierter Stammzellen aus dem peripheren Blut. Die Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut hat in den letzten Jahren international ebenfalls deutlich zugenommen. Inzwischen wurden weltweit mehr als 2.500 Nabelschnurbluttransplantationen durchgeführt.

Derzeit ist bei folgenden hämatologischen Erkrankungen bei bestimmten Erkrankungsformen und Erkrankungsstadien eine allogene Stammzelltransplantation Teil des

Therapiekonzeptes (42, 43):

- › Akute Leukämie und myelodysplastisches Syndrom
- › Chronisch-myeloische Leukämie
- › Multiples Myelom
- › Malignes Non-Hodgkin-Lymphom
- › Schwere aplastische Anämie und paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
- › Angeborene Immundefekte, Stoffwechseldefekte oder Hämoglobinopathien
- › Spezielle solide Tumoren (vor allem im Kindesalter).

Tabelle 5

Vergleich verschiedener Zielpunkte in randomisierten Studien zur allogenen Transplantation von Blutstammzellen (PBSZ) oder Knochenmark (KM)

Referenz	Stammzell-Quelle	N =	Neutrophile Tage (Median)	Thrombozyten Tage (Median)	aGvHD (%)	Extensive cGvHD (%)	Rezidive	Überleben	Ref.
Bensinger	KM	91	21	19	57	35	25 %*	54 %*	31
	PBSZ	81	16	13	64	46	14 %*	66 %*	
Blaise	KM	52	21	21	42	7,5*		65 %	33
	PBSZ	48	15	13	44	31*	ns	67 %	
Heldal	KM	31	23	21	10	13*	32*		44
	PBSZ	30	17	13	20	38*	3*	ns	
Powles	KM	19	23	18	47	26	37 %*	63 %	45
	PBSZ	18	17,5	11	50	30	0 %*	70 %	
Schmitz	KM	166	15	20	37*	11,5*			32
	PBSZ	163	12	15	50*	25*	ns	ns	
Vigorito	KM	19	18	17	16	21*			46
	PBSZ	18	16	12	22	55*	ns	ns	

Die Rekonstitution der neutrophilen Granulozyten bezieht sich auf das Erreichen von mindestens 500/μl und der Thrombozyten auf das Erreichen von mindestens 20.000/μl. Bei akuter GvHD (aGvHD), chronischer GvHD (cGvHD), Rezidiven und Überleben markieren die Sternchen (*) die Studien mit einem signifikanten Unterschied zwischen den Stammzellquellen.

In der Studie von Bensinger et al. ist das Gesamt-Überleben bei Patienten mit einer fortgeschrittenen hämatologischen Neoplasie in der PBSZT-Gruppe mit 57% versus 33% in der KM-Gruppe signifikant besser.



Letztendlich kann diese Aufzählung nur orientierenden Charakter haben. Die Indikation zur Stammzelltransplantation muss von einem spezialisierten Zentrum gestellt werden. Dabei ergibt sich häufig die differentialtherapeutische Entscheidung zwischen einer Stammzelltransplantation und konventioneller Chemotherapie. Somit sind die Indikationen im Fluss, zum Beispiel in Abhängigkeit von Fortschritten in der Chemotherapie oder neuen Erkenntnissen zu prognostischen Faktoren. Beispiele für solche Veränderungen in der Transplantationsindikation sind die Chronisch-myeloische Leukämie durch eine neue therapeutische Alternative mit dem Medikament Imatinib oder die Erkenntnisse zu den zytogenetischen und molekularen Prognosefaktoren bei der akuten myeloischen Leukämie, welche gezeigt haben, dass Stammzelltransplantationen nur bei bestimmten, durch z. B. zytogenetische Aberrationen charakterisierten Subgruppen, sinnvoll sind.

Die Zahl autologer Stammzelltransplantationen nahm seit 2001 in Deutschland wieder leicht zu, mit zuletzt über 2.300 autologen Stammzelltransplantationen im Jahr 2003. In mehr als 99 % dieser autologen Transplantationen wurden periphere Blutstammzellen eingesetzt. Plasmozytome (39.8 %),

andere Non-Hodgkin-Lymphome (32.4 %) und Morbus Hodgkin (5.8 %) sind die führenden Indikationen für autologe Stammzelltransplantationen. Bei den soliden Tumoren sind es vor allem Keimzelltumore, Neuroblastome, Weichteiltumore und Ewing-Sarkom, welche eine Transplantationsindikation darstellen. Das Mammakarzinom machte 1998 noch etwa 20 % der Indikationen für autologe Transplantation aus, im Jahre 2003 wurden dagegen nur noch 0,3 % der autologen Transplantationen in dieser Indikation durchgeführt.

In den letzten Jahren ist die Zahl allogener Ersttransplantationen in Deutschland mit etwa 1.400 Ersttransplantationen pro Jahr weitgehend unverändert geblieben. Es ergab sich jedoch eine Verschiebung der Indikationen: Die Zahl der allogenen Stammzelltransplantationen bei Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie hat aufgrund alternativer Therapiemöglichkeiten (Imatinib) abgenommen. Dies wurde jedoch durch Zunahme bei anderen Indikationen (vor allem akute myeloische Leukämie und myelodysplastische Syndrome) kompensiert. Etwa 90 % der allogenen Stammzell-Transplantationen erfolgten 2003 bei Patienten mit Leukämie oder Non-Hodgkin-Lymphom. Bei

78 % der im Jahre 2003 in Deutschland durchgeführten allogenen Ersttransplantationen wurden periphere Blutstammzellen eingesetzt. Der Anteil der Transplantationen von unverwandten Stammzellspendern hat in den letzten Jahren stetig zugenommen und liegt bereits über 50 %.

Detaillierte Informationen zu Häufigkeiten und Entwicklungen der autologen und allogenen Stammzelltransplantation in Deutschland können den Jahresberichten des Deutschen Registers für Stammzelltransplantation (DRST) entnommen werden (zugänglich über www.drst.de).

Ausblick

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation hat in den letzten 15 Jahren einen deutlichen Wandel vollzogen: Blutstammzellen haben sich als die hauptsächlich genutzte Stammzellquelle durchgesetzt. Die Transplantationen von nicht-verwandten Spendern nahmen deutlich zu. Neue Konditionierungsverfahren mit reduzierter Toxizität wurden entwickelt. Erweiterte Indikationen für die autologe und allogene Transplantation wurden etabliert. Neue Erkenntnisse zur Stammzellbiologie lassen eine Fortsetzung dieser Ent-



wicklung in der Klinik erwarten: Neue Substanzen können die Stammzellmobilisation verbessern. Die Stammzell dosis und zelluläre Komposition von Transplantaten wird optimiert. Mögliches Transdifferenzierungspotential von Stammzellen aus dem Knochenmark weckt die Hoffnung auf neue Anwendungen dieser Stammzellen in der regenerativen Medizin. Nabelschnurblut ist eine weitere Stammzellquelle, sowohl für die klassische hämatopoetische Stammzelltransplantation als auch für neue Indikationen, welche weiter exploriert werden. Die Manipulation von immunologisch aktiven Zellen, sei es durch Depletion entsprechender Zellen zur Vermeidung einer GvHD, oder zur gezielten Anreicherung und Differenzierung in der adoptiven Immuntherapie, können zu einer Verbesserung der Transplantatsergebnisse beitragen. Schließlich spielen die hämatopoetischen Stammzellen als Zielzellen von Gentransfer oder Genkorrektur eine wichtige Rolle bei der Entwicklung innovativer Therapieansätze für bisher unheilbare Erkrankungen.

- (1) Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of „stemness“. *Exp Hematol.* 2004; 32: 585-598.
- (2) Scholer HR. (The potential of stem cells. A status update). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2004; 47: 565-577.
- (3) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282: 1145-1147.
- (4) Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22: 487-500.
- (5) Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004; 116: 639-648.
- (6) Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med.* 2001; 7: 393-395.
- (7) Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood.* 2002; 99: 3089-3101.
- (8) McGuckin CP, Pearce D, Forraz N et al. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *Eur J Haematol.* 2003; 71: 341-350.
- (9) Sutherland HJ, Hogge DE, Lansdorp PM et al. Quantitation, mobilization, and clinical use of long-term culture-initiating cells in blood cell autografts. *J Hematother.* 1995; 4: 3-10.
- (10) Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med.* 1998; 4: 1038-1045.
- (11) Serke S, Johnsen HE. A European reference protocol for quality assessment and clinical validation of autologous haematopoietic blood progenitor and stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 27: 463-470.
- (12) Metcalf D. In vitro cloning techniques for haematopoietic cells: Clinical applications (abstract). *Annals of Internal Medicine.* 1977; 87: 483-488.
- (13) Wang JC, Doedens M, Dick JE. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood.* 1997; 89: 3919-3924.
- (14) Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol.* 2002; 30: 973-981.
- (15) Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I et al. Stem cell mobilization. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2003; 419-37.
- (16) Levesque JP, Liu F, Simmons PJ et al. Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood.* 2004; 104: 65-72.

