



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Untersuchungen von GMP-konformen Präparationstechniken von Nabelschnurblut : Quantifizierung von SCID repopulating cells

Autor: Gerodez Stephan
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. H. Eichler

Als Quelle von hämatopoetischen Zellen zur Transplantation zur Rekonstituierung eines funktionsfähigem Knochenmark bei Patienten mit malignen Erkrankungen nach myeloablativer Chemotherapie oder Bestrahlung hat sich neben Knochenmark und mobilisierten peripheren Stammzellen mittlerweile auch Nabelschnurblut als Quelle fest etabliert.

Das Hauptproblem hierbei ist die geringe Ausgangszellzahl die zur Verfügung steht. Der Erfolg einer solchen Transplantation hängt aber entschieden von der Zahl der HSC ab. Dies hat die Anwendung bisher vor allem auf den pädiatrische Patienten beschränkt. Derzeitige Bestrebungen versuchen durch ex vivo Expansion CD34+ Zellen, der Zellpopulation die die HSC enthält, die Zellzahl zur Transplantation zu erhöhen und somit eine großzügigere Indikation für Erwachsene stellen zu können. In Vorarbeiten im NOD/SCID Mausmodell aus dem Institut konnte festgestellt werden, dass die Transplantation durch angereicherter CD34+ Zellen entgegen der Erwartung zu keinem besserem Ergebnis führen als nicht selektierte Zellen.

Die Frage, wie groß der quantitative Unterschied im Gehalt an SRC's zwischen beiden Präparationstechniken ist, war Gegenstand dieser Arbeit.

Hierzu wurden frisch gewonnene Nabelschnurblute zunächst mit der Standard- Technik der *buffy coat*-Präparation im Volumen reduziert und eingefroren.

Nach dem Auftauen, wurde ein Teil der Zellsuspension mit Hilfe der immunmagnetischen Zells Selektion (CliniMACS) auf CD34+ Zellen isoliert. Der andere Teil der Zellsuspension wurde nicht weiter präpariert und in diesem Zustand transplantiert. Für diese gepaarten Experimente wurde die Technik des *limiting dilution assay* angewendet, um eine quantitative Aussage über die Frequenz der das Knochenmark der Mäuse repopulierenden Zellen, sogenannter SCID repopulating cells (SRC), zu beiden Präparationstechniken zu erhalten. Hierbei wurde für jede Präparationsmethode die gleiche Verdünnungsreihe mit 5 Stufen angelegt. Die Verdünnungen wurden so gewählt, dass die höchste Zellzahl sicher ein *engraftment*, die niedrigste Verdünnung sicher kein *engraftment* zur Folge haben wird. Nach 7 Wochen wurde Material aus Knochenmark und peripherem Blut auf den Gehalt an humanen Zellen mittels Durchflußzytometrie gemessen. Der Gehalt an *SCID repopulating cells* wurde mit Hilfe der Poisson- Statistik ermittelt und die Ergebnisse verglichen. Ein Teil der Knochenmarksproben, der durchflußzytometrisch einen humanen Zellanteil unter der Sensitivitätsgrenze von 1% lag, wurde zusätzlich mit einer quantitativen real time PCR untersucht. Ziel war es den Bereich der Verdünnungsstufen und durch weitere valide Ergebnisse die Berechnung der Frequenz der SRC's zu verfeinern. Da alle Proben, auch der niedrigsten Transplantationsstufen als positiv *engrafted* bewertet werden mussten, konnte diese Berechnung nicht genauer ermittelt werden.

Der Gehalt an SRC's in den Knochenmarksproben lag bei 1/53.946 für die CD34+ selektierten Zellen und 1/32.079 für die unselektierten Zellen. Bei den peripheren Blutproben konnte entsprechend 1/169.594 für die CD34+- selektierten Zellen und

1/127.591 für die unselektierten Zellen ermittelt werden. Dabei ist ein Verlust von SRC's in der selektierten Fraktion von 60% für KM und von 40% für peripheres Blut feststellen. Beim Vergleich der Kurven des prozentualen Anteils humaner Zellen pro Verdünnungsstufe der selektierten und unselektierten Zellen jeweils für Knochenmark und peripheres Blut läßt sich statistisch kein signifikanter Unterschied feststellen. Der Grund hierfür könnte in der niedrigen Reinheit der selektierten Zellen liegen, wobei es unklar bleibt, weshalb diese in den Experimenten so niedrig war.