

Martin Großhans

Dr. med.

Einfluss serumfreier in-vitro-Kulturbedingungen auf das Teilungsverhalten und das Schicksal primitiver hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. A. D. Ho

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen den initialen Zellteilungsvorgängen und dem funktionellen Potenzial von humanen hämatopoetischen Stammzellen in Abhängigkeit von Serumfaktoren und verschiedenen Zytokinen. Unter klinisch applizierbaren, serumfreien Bedingungen wurde die initiale Zellteilungsgeschichte individuell sortierter CD34+/CD38- Zellen aus humanem Nabelschnurblut erfasst und in verschiedenen in-vitro-Testsystemen mit funktionellen Eigenschaften korreliert. Dabei wurden sowohl primitive und den hämatopoetischen Stammzellen äquivalente Vorläuferzellen (ML-IC) charakterisiert als auch bereits liniendeterminierte koloniebildende Progenitoren (CFC). In den experimentellen Ansätzen wurde der Einfluss von serumfreien in-vitro-Bedingungen in zwei unterschiedlich wirksamen Zytokinmilieus unter folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Einfluss von klinisch applizierbaren, serumfreien in-vitro-Bedingungen auf die initiale Zellteilung in Abhängigkeit von der Zytokinstimulation
2. Korrelation der initialen Zellteilung mit funktionellen Parametern in Abhängigkeit vom Serumgehalt der Kulturbedingungen
3. Einfluss serumhaltiger und serumfreier Kulturmedien auf die Teilungsasymmetrie

Es konnte gezeigt werden, dass sich unter serumfreien in-vitro-Bedingungen das initiale Zellteilungsverhalten praktisch gegensätzlich zu serumhaltigen Kulturbedingungen in Abhängigkeit der Zytokinstimulation ändert. Unter Einfluss von einem ontogenetisch spät wirksamen Zytokincocktail wurden in serumfreiem Medium praktisch alle Zellen zur initialen Teilung angeregt. Im Gegensatz dazu blieb bei gleicher Zytokinstimulation in der serumhaltigen Kultur fast jede zehnte Zelle in Teilungsrufe.

Unter Stimulation mit Zytokinen, die primär auf die primitiven Zellen wirken, ergab sich überraschenderweise ein umgekehrtes Verhältnis: Unter Serumbedingungen verbleiben mehr

Zellen in Teilungsrufe als in serumfreiem Medium. Auf die Proliferationskinetik sich in Teilung befindlicher Zellen haben die Serumfaktoren jedoch keinen Einfluss.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Frequenz der ML-IC nach zehn Tagen Zellteilungskultur unter den unterschiedlichen Bedingungen gleich detektiert wurde und keine signifikanten Unterschiede aufwies. In Übereinstimmung zu Vorarbeiten konnte bestätigt werden, dass sich die primitiven und stammzelläquivalenten Vorläuferzellen (ML-IC) vor allem aus den nicht oder langsam proliferierenden Zellen rekrutieren. Auch bereits liniendeterminierte koloniebildende Progenitoren (CFC) wurden durch serumfreie Kulturbedingungen nicht beeinflusst.

Die asymmetrische Zellteilungsrate der CD34+/CD38- Zellen wurde unter serumfreien in-vitro-Bedingungen nicht signifikant verändert: Sie lag zwischen 20 und 25% und bestätigte damit Voruntersuchungen, die bereits mehrfach bewiesen hatten, dass die asymmetrische Zellteilungsrate intrinsisch determiniert ist und nur in Zusammenhang mit zellulären Faktoren des Umgebungsmilieus verändert werden kann. Auch die funktionellen Vorläuferzellen zeigten keine Änderungen ihrer Zellteilungscharakteristika, wenn sie unter serumfreien Bedingungen kultiviert werden. Die primitiven ML-IC blieben unter allen Bedingungen in relativer Teilungsrufe und teilten sich unabhängig von Serumfaktoren oder Zytokinen überwiegend asymmetrisch. Die liniendeterminierten CFC befanden sich in überwiegender Anzahl in Proliferation und teilten sich unabhängig von den extrinsischen Faktoren symmetrisch.

Die vorliegende Arbeit bestätigte erstmals, dass Serumfaktoren zwar das initiale Proliferationsverhalten individueller humaner CD34+/CD38- Zellen beeinflussen können, jedoch in den funktionellen Populationen der Stamm- und Progenitorzellkandidaten weder einen Einfluss auf Teilungsasymmetrie oder Zellschicksal haben.