



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Untersuchungen zur Selektion hämatopoetischer Progenitorzellen
aus kryokonserviertem Plazentarestblut**

Autor: Christian Beck
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. Harald Klüter

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Vorgehensweise zu entwickeln, mit deren Hilfe volumenreduzierte kryokonservierte Plazentarestblut-Präparate aufgetaut und einer Selektion CD34 positiver Progenitorzellen zugeführt werden können. Die Problematik der prinzipiell mit Zellverlusten einhergehenden Clotbildung konnte durch den Einsatz von rhu-DNase gelöst werden. Dieses Enzym führt zu einer Degradation extrazellulärer DNA. In einer Untersuchung von 50 Einzelproben, an denen unterschiedliche Konzentrationen an rhu-DNase getestet wurden, zeigte, dass dazu eine Konzentration von 10 I.E. pro ml Zellsuspension ausreichend ist. Auf eine Supplementierung mit zweiwertigen Ionen und die Vermeidung von diese Ionen bindenden Substanzen, wie z.B. EDTA, muss dabei geachtet werden, um eine optimale Funktion des Enzyms sicherzustellen. Eine unerwünschte Degradation von Adhäsionsmolekülen wurde anhand von Expressionsanalysen durchflußzytometrisch überprüft. Dabei konnte kein negativer Einfluss von rhu-DNase auf die Adhäsionsmoleküle L-Selektin, ICAM-1 oder LFA-1 detektiert werden. Allerdings fand sich eine signifikante Abnahme unter der über 10 minütigen Einwirkung von DMSO in einer Konzentration von 5,5%. Dies könnte auf die Aktivierung einer Matrix-Metalloproteinase durch DMSO zurückzuführen sein. In einem zweiten Schritt wurde ein Protokoll für eine GMP-gerechte Aufbereitung kryokonservierten Plazentarestblutes erstellt. Dabei erwies es sich hinsichtlich der späteren Reinheit der CD34⁺ Zellen in der Positivfraktion als bedeutsam, die Waschüberstände vollständig zu dekantieren. Auch zeigte sich ein stetiger Lernprozess in Bezug auf die Umgehensweise mit den Präparaten, der diese Art der Zellpräparation nur in der Hand von Fachpersonal sinnvoll erscheinen lässt. Insgesamt konnte etwa die Hälfte der Stamm- und Progenitorzellen für eine spätere Zellexpansion gewonnen werden. Die solcherart selektierten CD34⁺ Zellen wurden schließlich in gepaarten Experimenten im xenogenen NOD/SCID-Maus-Modell auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das Knochenmark der subletal bestrahlten Tiere zu repopulieren. Dabei fand sich ein signifikant schlechteres Anwachsen der positiv selektierten Zellen. Dies warf die Frage auf, ob die für das bessere Anwachsen verantwortlichen Zellen der unselektierten Probe sich in der Negativfraktion finden. Die transplantierten Zellen der Negativfraktion allein führten jedoch zu keinem messbaren Engraftment. Möglicherweise ist allerdings ein Zusammenwirken aus CD34 negativen und CD34 positiven Zellen notwendig. Aktuelle Studien über einen Erfolg von Co-Transplantationen hämatopoetischer und mesenchymaler Stammzellen scheinen in diese Richtung zu weisen.