

Anja Seckinger

Dr. med.

Molekulare und funktionelle Untersuchung adulter mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Geboren am 22.05.1980 in Sinsheim

Reifeprüfung am 25.06.1999 in Östringen

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1999/2000 bis SS 2006

Physikum am 28.08.2001 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 11.05.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

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

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente Zellen mit einem hohen Expansionspotential *in vitro* und der Fähigkeit, sich in verschiedene mesodermale Zellen wie Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erfolgreich MSC aus humanem, caninem und porcinem Knochenmark isoliert und unter verschiedenen Bedingungen (Medium 1 und Medium 2) expandiert. Die Zellen zeigen dabei das typisch adhärente, fibroblastoide Wachstumsverhalten. Die humanen Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie und Differenzierung in Richtung der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Linie *in vitro* weiter untersucht und mit MSC aus Nabelschnurblut bzw. Fettgewebe sowie terminal differenzierten Fibroblasten (Hs68) verglichen. Aufgrund ihrer Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen, ihrem Antigenexpressionsmuster und dem trilinearen Differenzierungspotential entsprechen unsere Zellen somit der aktuell gültigen MSC-Definition der *International Society for Cellular Therapy*. Dabei zeigte sich, dass MSC aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial bzw. nach Kultur unter verschiedenen Bedingungen selbst durch Kombination verschiedener Antikörper nicht voneinander zu unterscheiden sind und eine Abgrenzung von Fibroblasten nicht möglich ist. Im Gegensatz dazu war jedoch bei den Fibroblasten *in vitro* keine Differenzierung zu beobachten. Der alleinige Einsatz der Durchflusszytometrie zur Charakterisierung von MSC ist also kritisch zu bewerten.

Eine weitergehende Charakterisierung der MSC ist jedoch im Hinblick auf die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen und einen späteren Einsatz in der Klinik sinnvoll. Dazu wurden die humanen Zellen mittels Proteomanalyse untersucht und die Ergebnisse mit den Daten der Genexpressionsanalysen unserer Arbeitsgruppe verglichen. Gene aus der funktionellen Gruppe von Stoffwechsel und Mitochondrien sind in MSC-M1 stärker exprimiert als in MSC-M2, im Gegensatz dazu werden an der Muskelentwicklung, der Actin-Bindung, der Neurogenese, der Zelldifferenzierung, der Morphogenese und der Skelettentwicklung beteiligte Gene in MSC-M2 signifikant stärker exprimiert. Diese Tendenz konnten wir auch auf Proteinebene sehen. Insgesamt war jedoch keines der identifizierten Proteine spezifisch für MSC. Auch in Korrelation mit den Expressionsdaten von Hs68 konnten wir keinen einzelnen Marker finden, der ausschließlich in MSC exprimiert wird. Allerdings kann die Zusammensetzung des hier durch 2D-Gelelektrophorese erhaltenen globalen Proteoms der MSC als verlässliche Qualitätskontrolle von MSC *in vitro* dienen.

Durch den Wechsel der Kulturbedingungen zwischen Medium 1 und Medium 2 konnte zudem gezeigt werden, dass einige der gefundenen molekularen und morphologischen Unterschiede durch extrinsische Faktoren bedingt sind. Die Kulturbedingungen haben somit einen stärkeren Einfluss auf die Gen- und Proteinexpression der MSC als die interindividuellen Unterschiede verschiedener Spender.

Es wird deutlich, dass eine klare Definition der verwendeten Ausgangspopulation mittels molekularer Parameter sowie einheitliche Isolationsmethoden und Kulturbedingungen für einen Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen und damit nicht zuletzt als Voraussetzung für eine sichere klinische Anwendung der MSC unerlässlich sind.

Daneben wurden die MSC *in vitro* auf ihre immunologischen Eigenschaften hin untersucht. MSC exprimieren intermediäre Level MHC-I, sind jedoch negativ für MHC-II. Eine Expression für die Auslösung einer Immunantwort nötiger kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86, CD40 oder CD40 Ligand ist bei MSC ebenfalls nicht nachweisbar. Auch im Rahmen der osteogenen Differenzierung *in vitro* behalten die Zellen dieses Muster bei. In der gemischten Lymphozytenkultur konnte bestätigt werden, dass allogene MSC keine relevante Immunantwort auslösen.

Zur näheren Untersuchung der *homing*-Eigenschaften allogener MSC konnten wir im caninen Großtiermodell nach Radiofrequenz-Katheterablation und anschließender periphervenöser Applikation von markierten allogenen MSC ein *homing* der Zellen ins geschädigte Myokard beobachten. Dabei ist das *homing*-Verhalten unabhängig von der Größe der Nekrose.

Selbst kleine Läsionen stellen einen ausreichend großen Anreiz für die applizierten MSC dar, in das betroffene Gewebe einzuwandern. In peripheren Organen konnten wir keine Zellen nachweisen. Im porcinen Modell einer globalen Ischämie kam es nach permanenter Ligation des *Ramus interventricularis anterior* der linken Koronararterie und anschließender periphervenöser Transplantation markierter allogener MSC ebenfalls zu einem *homing* der Zellen ins geschädigte Myokard. Während im nicht-ischämischen Herzgewebe keine Zellen nachweisbar waren, konnten wir dagegen eine auffällig starke Infiltration von Leber, Lunge und Milz beobachten

Mit der von uns im Großtiermodell etablierten Methode einer lokalen Schädigung mittels Radiofrequenz-Katheterablation des rechten Herzohres steht ein neues Instrument zur Untersuchung des lokalen *homings in vivo* zur Verfügung. Durch die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten immunmodulatorischen Charakteristika und ihre Eigenschaft, in Regionen mit einem Gewebeschaden einzuwandern, stellen humane mesenchymale Stammzellen somit ein vielversprechendes Objekt für allogene Transplantations- und Zelltherapieansätze dar.