

Susanne Hedwig Hämmerling
Dr. med.

Humane endotheliale Vorläuferzellen- Isolierung, phänotypische und funktionelle Charakterisierung sowie Effekte der Überexpression von HIF1-alpha

Geboren am 25.05.1987 in Köln
Staatsexamen am 08.12.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. T. J. Dengler

Zur Behandlung der Atherosklerose, eine der häufigsten Krankheitsursachen in der zivilisierten Welt, wurden in den letzten Jahren neue Therapieansätze entwickelt. Dazu gehört auch der Einsatz von Stammzellen zur Bildung neuer Blutgefäße. Der Entdeckung folgend, dass im Knochenmark und auch in peripherem Blut Vorläuferzellen vorhanden sind, die neoangiogenetisches Potential besitzen, wurden verschiedene Versuche unternommen, diese endothelialen Vorläuferzellen zu isolieren und zu charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die endothelialen Vorläuferzellen durch ein Adhärenzverfahren aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes isoliert. Die Zellen wurden sowohl auf RNA- und Proteinebene als auch anhand eines in vitro-Angiogenesemodells im Vergleich zu HUVEC charakterisiert.

Es zeigte sich, dass diese Vorläuferzellen aus zwei Populationen bestehen. Die eine Population entsprach den EPC (endothelial progenitor cells), die nicht proliferieren und auf Matrigel ohne Hilfe von Endothelzellen keine retikulären Strukturen bilden können. Die andere Population waren spätauswachsende Zellen (LOC, late outgrowth cells genannt). Die LOC sind in ihrer starken Proliferation und ihrer Fähigkeit netzartige Strukturen zu bilden der klassischen Endothelzelllinie HUVEC ähnlich. LOC wurden nur in einigen wenigen Kulturansätzen beobachtet. Die Gründe hierfür sind unklar, liegen aber wahrscheinlich in der Variabilität der Blutspender.

Bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung mit einem Satz von Antikörpern gegen Oberflächen- und intrazelluläre Antigene konnten auf beiden Zellpopulationen sowohl typisch endotheliale als auch monozytäre Marker nachgewiesen werden. Der Nachweis monozytärer Marker widerspricht ursprünglichen Arbeiten, dass es sich bei den endothelialen Vorläuferzellen genannten Zellen tatsächlich um Endothelzellen handelt, die sich aus Vorläuferzellen differenzieren. Somit lässt sich das Paradigma, dass nur endotheliale Zellen zur Gefäßneubildung befähigt sind, nicht bestätigen. Aufgrund der sehr geringen Expression an Stammzellmarkern konnte der Stammzellcharakter der EPC nicht bestätigt werden.

Im Vergleich zwischen LOC und EPC zeigten LOC eine äusserst geringe Expression an CD14 und CD45. Dies rückt sie evtl. der endothelialen Zellreihe näher.

Ein weiteres interessantes Ergebnis ist der erstmals in dieser Arbeit beschriebene Befund, dass die EPC sowohl stark HLA Klasse I- und II-Antigen als auch kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 exprimieren und somit Antigen-präsentierenden Zellen phänotypisch ähnlich sind. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob die EPC effizient Antigen präsentieren können. Dieses könnten für einen therapeutischen Einsatz in vivo von Bedeutung sein, vor allem bei Verwendung

von EPC, die mit viralen Vektoren genetisch modifiziert sind.

Ein eventuelles Problem ist die von uns und anderen Autoren beobachtete Heterogenität der EPC-Kulturen, die wahrscheinlich an den unterschiedlichen Spendern liegt.

Um bei einem klinischen Einsatz die therapeutische Wirksamkeit zu erhöhen, wurde zur Transduktion von EPC und LOC ein HIF1 α -Adenovirus hergestellt und eingesetzt.

HIF1 α ist ein Transkriptionsfaktor, der zur verstärkten Expression multipler Gene, vor allem angiogenetischer, führt. Um eine konstante Überexpression zu erzielen, wurde eine konstitutiv exprimierbare Modifikation von HIF1 α (Greg-Semenza-Klon) verwendet. Es zeigte sich, dass sich EPC nur schwierig mit HIF1 α -Adenovirus oder dem Kontrollvirus GFP-Ad transduzieren liessen. Bei einer MOI > 1000 wurde eine mässige Überexpression von HIF1 α beobachtet, die allerdings die Expression angiogenetischer Wachstumsfaktoren wie VEGF und anti-apoptotischer Faktoren wie BCL2 und BCLxL nicht erhöhte. Wahrscheinlich ist die hohe MOI zytopathisch für die Zellen. Im Gegensatz dazu waren LOC sehr effizient mit HIF1 α -Ad transduzierbar, was auch zu einer Hochregulierung von VEGF und PlGF führte.

Für die Zukunft ist es erstrebenswert, durch Verbesserung der Kulturbedingungen die Heterogenität der EPC- und LOC-Kulturen zu verringern. Ausserdem sollten effizientere Vektoren für die Transduktion von EPC generiert werden. Schliesslich sind in vivo-Versuche, vor allem mit genmanipulierten EPC und LOC nötig, um das Potential der endothelialen Vorläuferzellen zu untersuchen. Hierbei sind auch Untersuchungen zu den immunogenen Eigenschaften von EPC von grossem Interesse.