

Frederik Wein

Dr. sc. hum.

Mesenchymale Stromazellen und Hämatopoetische Progenitorzellen: Ein Modellsystem zur Untersuchung der Interaktion mit der Stammzellnische

Geboren am 02.06.1976 in Nürtingen

Diplom der Fachrichtung Biologie am 17.11.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

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

Die humane hämatopoetische Stammzelle (HSC) residiert im Knochenmark und ist die Vorläuferzelle des lympho-hämatopoetischen Systems. In den letzten Jahren akkumulierten sich die Beweise dafür, dass ein adhäsiver Kontakt mit dem umgebenden, zellulären Milieu (die so genannte Stammzellnische) für die grundlegenden Regulationsprozesse der HSC eine wesentliche Rolle spielt. Die genaue Zusammensetzung der beteiligten Adhäsionsproteine und ihre Funktion an den Mechanismen der Selbsterneuerung und Differenzierung sind noch weitgehend unaufgeklärt. Mit hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC, CD34 positive Zellen aus dem Nabelschnurblut) und supportiven Feederzellen wurde in dieser Arbeit ein rein humanes *in vitro* Modellsystem entwickelt, um die Interaktionsvorgänge in der Stammzellnische zu untersuchen.

Als supportives Zellsurrogat für die Nische wurden zunächst vier verschiedene Typen mesenchymaler Stromazellen (MSC) in Betracht gezogen. Die MSC-Präparationen stammten aus dem Nabelschnurblut (CB-MSC-M3), dem Fettgewebe (AT-MSC-M1) und dem Knochenmark, wobei die MSC aus dem Knochenmark zwei unterschiedlichen Expansionsprotokollen unterworfen wurden (BM-MSC-M1 und BM-MSC-M2). Am Beispiel der MSC aus dem Knochenmark wurde der Einfluss des Expansionsprotokolls auf die Morphologie und das Transkriptom dieser Zellen deutlich.

Auch bei Kokultivierungsversuchen mit HPC, bei denen die MSC als Zellfeeder dienen, wurden die Unterschiede zwischen den Präparationen und deren Einfluss auf HPC deutlich. Adhäsionsversuche zeigten, dass HPC zu den supportivsten MSC-Präparationen die stärkste Affinität aufwies. Als „supportiv“ werden die MSC-Präparationen bezeichnet, die den Erhalt von Stammzellcharakteristika kokultivierter HPC unterstützen. Die MSC-Präparation aus dem Knochenmark (BM-MSC-M1) offenbarte im Gegensatz zu den MSC aus dem Fettgewebe herausragende adhäsive und supportive Eigenschaften. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit ihrer Eigenschaft als Osteoblastenvorläufer, welche als äußerst wichtige Interaktionspartner der HSC in der Knochenmarknische betrachtet werden. Aus diesen Gründen erschien die Verwendung der BM-MSC-M1 für weitere Untersuchungen der Zell-Zell-Interaktion sinnvoll.

Weitere Adhäsionsversuche demonstrierten, dass die Adhäsion der Zellen aus Nabelschnurblut von ihrem Differenzierungsgrad abhängig ist. Verschiedene Versuchsansätze bestätigten eine stärkere Adhäsion in den jeweils unreiferen HPC-Fractionen. Diese Resultate implizierten erneut einen Zusammenhang zwischen dem Stammzellpotential und der heterotypischen Adhäsion. Um die Zusammensetzung der Adhäsionsproteine auf der Seite der HPC aufzuschlüsseln, wurde eine differentielle Genexpressionsanalyse der adhären *versus* der nicht adhären HPC-Fraction durchgeführt. Auf diese Weise konnte eine Vielzahl spezifischer Junction-Proteine identifiziert werden, die in der adhären HPC-Fraction stärker exprimiert wurden als in der nicht adhären Fraction. Um potentielle Interaktionswege zu identifizieren, wurden die Genexpressionsprofile der supportiven BM-MSC und adhären HPC erneut ausgewertet und miteinander in Beziehung gesetzt. Diese Analysen deuteten auf Integrine (ITGB1, ITGB1A4/5), Junction-Proteine (Cadherine11, N-Cadherin) und Zellmatrixkomponenten (Fibronectin1, Thrombospondin 2, CTGF) als relevante Faktoren hin. Die Beteiligung einiger dieser Proteine an der heterotypischen Zell-Zell-Interaktion konnte funktionell bestätigt werden. Die Resultate der Adhäsionsversuche mit blockierenden Antikörpern gegen ITGB1, CD44 und N-Cadherin und die Genexpressionsdaten implizieren eine komplexe Interaktion der HSC mit ihrer Nische, an der eine Vielzahl von Adhäsionsproteinen beteiligt ist. Bemerkenswert ist die signifikante Verringerung der LTC-IC-Frequenz durch die spezifische Hemmung des N-Cadherinvermittelten Kontaktes. Dieser Versuch verdeutlicht am Beispiel eines bestimmten

Adhäsionsproteins den engen Zusammenhang zwischen der adhäsiven Zell-Zell-Interaktion und dem Erhalt von Stammzellcharakteristika.

Die Aufklärung adhäsionsabhängiger Mechanismen der Selbsterneuerung und Differenzierung kann wesentlich zur *in vitro* Expansion von HSC beitragen. Die Möglichkeit, den hämatopoetischen Stammzellpool eines Patienten zu vergrößern, würde einen bedeutenden klinischen Vorteil mit sich bringen.