

Ulf Christian Krause

Dr. med.

Charakterisierung und Vergleich mesenchymaler Progenitorzellen aus humanem Knochenmark und Nabelschnurblut

Geboren am 08.03.1973 in Stuttgart

Reifeprüfung am 26.06.1992 in Speyer

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis WS 2000/01

Physikum am 01.09.1994 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Mannheim

Praktisches Jahr in Mannheim und Heidelberg

Staatsexamen am 29.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

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

Humane mesenchymale Progenitorzellen (MPC) sind multipotente Zellen, die in verschiedene Zelltypen des Knochenmarks (Knochen, Knorpel, Fettzellen und Knochenmarkstroma) differenzieren können und eine hohe Proliferationskapazität *in vitro* haben. Dies macht sie zu idealen Ausgangszellen für humane Zell- und Gentherapieansätze sowie zum Tissue Engineering mesenchymaler Gewebe. Einer der erfolversprechendsten Tissue Engineering Ansätze ist ihre Verwendung zum autologen Knochenersatz. Dabei bilden von *in vitro* expandierten MPC abgeleitete osteogene Zellen eine extrazelluläre Matrix (ECM) auf dreidimensionalen Gerüsten, füllen so den Substanzdefekt auf und stabilisieren den Defekt.

Für eine breite klinische Nutzung ist es wichtig, dass aus dem Ausgangsmaterial zuverlässig genug Zellen für die jeweilige Anwendung in einem möglichst kleinen Probenvolumen gewonnen werden können und die benutzte Isolationsmethode für den Patienten kein zusätzliches Risiko darstellt. In über 30-jähriger klinischer Erfahrung mit hämatopoetischen Stammzellen (HSC) wurden drei Quellen zur Gewinnung von Zellen etabliert, die diesen Anforderungen entsprechen: Knochenmark (KM), Nabelschnurblut (CB) und peripher-venöses Blut (PB).

Um zu prüfen, ob diese Ausgangsmaterialien auch als mögliche Quellen für die Gewinnung von MPC in Frage kommen, haben wir mononukleäre Zellen und definierte immunmagnetisch oder durchflusszytometrisch angereicherte Subpopulationen in verschiedenen Medien für MPC und multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC) kultiviert und die erhaltenen Zellen charakterisiert.

Aus allen 14 KM Proben und in sieben der 28 CB Proben (25%) konnten erfolgreich adhärenz fibroblastoide Zellen mit dem für MPC typischen Wachstumsverhalten, Oberflächenantigen-Expressionsmuster (d.h., negativ für CD34, CD38, CD45 und HLA-DR sowie positiv für CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166 und HLA-ABC) sowie osteogenem, chondrogenem und adipogenem Differenzierungspotenzial isoliert werden. Demgegenüber konnten in unserem Ansatz keine MPC aus G-CSF mobilisiertem oder unbehandeltem Peripherblut gewonnen werden.

Um zu untersuchen, ob verschiedene Expansionsbedingungen zu Zellpopulationen mit unterschiedlichen osteogenen Differenzierungseigenschaften führen, wurden Zellen in Parallelansätzen unter Standardbedingungen (Plastikadhärenz, 10% Serum) und Verfaillie-Bedingungen (Fibronectin-beschichtete Kulturflaschen, 2% Serum) kultiviert und differenziert. Als Kontrollparameter der osteogenen Differenzierung dienten neben morphologischen Kriterien und histochemischen Nachweisen der quantitative RNA-Expressionsverlauf für die Osteoblastenreifung wichtiger Gene (Bone Sialoprotein [BSP], Bone Morphogenic Protein [BMP]-2, Osteocalcin, Cbfa-1, Alkalische Phosphatase [AP]) sowie die von den Zellen gebildete Extrazellulärmatrix.

In allen Fällen konnten Zellen erfolgreich unter MPC als auch MAPC Bedingungen gewonnen und im Verlauf der osteogenen Differenzierung zur Bildung einer ECM angeregt werden. Der Phänotyp und die Wachstumseigenschaften der unter MAPC Bedingungen gewachsenen Zellen deuten jedoch auf eine unreifere Population hin. Während der osteogenen Differenzierung produzierten diese Zellen eine komplexere ECM mit signifikant höheren Ca^{2+} - und PO_4^- -Werten in den Ablagerungen ($p < 0,05$) und zeigten einen deutlicheren Anstieg der BSP-, BMP-2- und AP-Expression im Vergleich zu den Zellen, die in Standardmedium kultiviert wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit nach erfolgreicher Etablierung der Methoden zur Isolierung, Expansion, Charakterisierung und Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen folgende Punkte gezeigt werden:

1. Knochenmark ist im Vergleich zu Nabelschnurblut und peripherenösem Blut die zuverlässigste Quelle zur Gewinnung von mesenchymalen Progenitorzellen.
2. Unterschiede in der Aufarbeitung und Kultivierung des Ausgangsmaterials führen *in vitro* zu Zellpopulationen mit unterschiedlichem osteogenem Differenzierungsverhalten. Ob dies eine Relevanz für das Tissue Engineering *in vivo* hat, muss in Tierexperimenten geprüft werden.
3. Der hauptsächlich für diesen Unterschied verantwortliche Faktor ist die Zelldichte, d.h. der Konfluenzgrad der mesenchymalen Progenitorzellkulturen.