



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung**

**In vitro Expansion hämatopoetischer Stammzellen aus
MDS-Patienten zur Verbesserung des präklinischen
Xenograftmodells**

Autor: Polina Timiriasova
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. D. Nowak

Zur Durchführung präklinischer funktioneller Versuche zur Aufklärung von Pathomechanismen myelodysplastischer Syndrome (MDS) werden häufig primäre CD34-positive hämatopoetische Stammzellen (HSCs) dieser Patienten verwendet. Der limitierende Faktor dabei ist jedoch die meistens stark begrenzte Anzahl dieser undifferenzierten Zellen in den Knochenmarkproben der Patienten. Wir verfolgten daher in dieser Arbeit die Fragestellung, ob sich MDS-Stammzellen durch *in vitro* Stammzellexpansionsprotokolle vermehren lassen, ohne dass dabei Ihre Stammzellfunktionalität verloren geht. Wir untersuchten in vergleichenden Analysen die Fähigkeit des Engraftments von expandierten HSCs im Vergleich zu nativen unveränderten HSCs in einem murinen MDS-Xenograftmodell.

Zur *in vitro* Expansion behandelten wir CD34-positive MDS-HSCs mit sechs verschiedenen, bereits publizierten Zytokinmischungen zur Stammzellexpansion über einen Zeitraum von 11 - 13 Tagen. Damit konnten wir eine durchschnittlich 5,6-fache Expansion erreichen (95 %-CI [3,89; 7,39]). In allen experimentellen Gruppen induzierte die Expansion keine signifikante Differenzierung der Stammzellen gemessen an den durchflußzytometrisch gemessenen Stammzellmarkern CD34⁺CD38⁻. Darüber hinaus konnten wir in allen Bedingungen eine erhaltene koloniebildende Aktivität in einem Standard Colony-forming-unit-Assay nachweisen. Insbesondere mit Hinzugabe des FMS-ähnlichen Tyrosinkinase 3 Liganden (Flt-3-L) in Kultur ließ sich eine 2,5-fach bessere Expansion von MDS-HSCs im Vergleich zu Zytokincocktails ohne Flt-3-L erzielen. Damit stellte sich Flt-3-L als wesentlicher Hauptfaktor zur *in vitro* Expansion von MDS-HSCs dar. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe anderer Zytokine, die sich für die Expansion gesunder HSCs als effektiv gezeigt hatten, wie z. B. Angiopoietin-like 5 (Angptl-5), Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2), UM171 oder PVA bei MDS-HSCs nicht zu einem expansiven Effekt.

Zur Testung des differentiellen Engraftments in Abhängigkeit des vorangegangenen *in vitro* Expansionsprotokolls in einem murinen Xenograftmodell wurden insgesamt 4 MDS-Patientenproben in insgesamt 63 NSG-Mäuse intrafemoral transplantiert. Das Engraftment wurde jeweils 12 und 24 Wochen nach der Transplantation gemessen. Dabei zeigten sich deutlich höhere Engraftmentraten in der nativen nicht expandierten Kontrollgruppe (73,3 % der Mäuse mit positiven Engraftment) im Vergleich zu den *in vitro* expandierten HSCs (29 % der Mäuse mit positivem Engraftment). Die unterlegenen Engraftmentraten von expandierten MDS-HSCs ließen sich nicht durch Transplantation höherer Zellzahlen verbessern.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass sich MDS-HSCs in gewissem Umfang zwar zahlenmäßig erfolgreich *in vitro* expandieren lassen, aber nur unter Verlust an Funktionalität im Engraftment Assay eines murinen Xenograftmodells. Eine *in vitro* Expansion MDS-HSCs ist daher nicht geeignet, um limitiertes MDS Biomaterial für präklinische Versuchszwecke zu vermehren.