1 ZUSAMMENFASSUNG

Adulte humane, multipotente hämatopoetische Stammzellen sind durch die Expression des Antigens CD133 charakterisiert. Diese Zellen ($CD133^+$) haben möglicherweise ein breites Differenzierungspotenzial auch in nicht-hämatopoetische Gewebe und könnten deshalb für neue Therapieansätze genutzt werden. Zurzeit wird die Anwendung solcher stammzellbasierter Therapieformen aber noch durch die niedrige Frequenz der $CD133^+$ Zellen in Blut und Knochenmark limitiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die ex-vivo Expandierbarkeit und die Differenzierungskapazität von hämatopoetischen $CD133^+$ Stammzellen aus dem peripheren Blut in die hämatopoetische und endotheliale Richtung untersucht. Dabei wurde diese Zellpopulation auch auf Einzelzellebene analysiert, um festzustellen, ob $CD133^+$ Zellen gemeinsame Ursprungszellen für Blut- und Blutgefäßzellen, so genannte Hämangioblasten, enthielten.

Mittels einer immunmagnetischen Methode konnten $CD133^+$ Stammzellen in hoher Reinheit (ca. 98%) aus Leukaphereseprodukten isoliert werden. Anschließend wurde ein auf den Zytokinen SCGF, VEGF und FLT3L basierendes Zellkultursystem entwickelt, mit dem die isolierten Zellen ex-vivo expandiert werden konnten. Der Faktor der Zellzahlzunahme betrug nach 5 Wochen in den Expansionskulturen im Mittel 2190. Immunphänotypische Analysen von Stammzellmarkern in diesem Kulturzeitraum ergaben eine Expansion der $CD133^+$ Zellen um das 260-fache und der $CD34^+$ Zellen um das 36-fache. Funktionelle Stammzellassays zeigten eine Zunahme des koloniebildenden Potenzials der ex-vivo expandierten Stammzellen. Die Zahl der unreifen, multipotenten CFU-GEMM Kolonien nahm um den Faktor 48 zu.

Über 32 Tage kultivierte Stammzellen konnten das durch Bestrahlung abgetötete Knochenmark von immuninkompetenten NOD-SCID Mäusen repopulieren. Drei Monate nach der Transplantation waren bei 75% der Tiere menschliche Blutzellen aller Linien nachweisbar, was das Vorhandensein funktioneller, multipotenter und zur Selbsterneuerung fähiger Stammzellen in den Expansionskulturen belegte.

Funktionelle und immunphänoptypische Analysen der expandierten $CD133^+$ Zellen ergaben außerdem, dass auch Endothelprogenitorzellen unter den etablierten Kulturbedingungen erfolgreich proliferieren konnten. Die Populationen der die Endothelmarker VE-Cadherin und vWF exprimierenden Zellen vermehrten sich in fünf Wochen um mehr als den Faktor 10000. Endotheliale Colony-Assays zeigten eine fast 2000-fache Zunahme der Progenitoren mit endothelialer Potenz.

Zusammenfassend lässt sich für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit feststellen, dass Zellkulturbedingungen entwickelt wurden, durch die sowohl hämatopoetische Stammzellen als auch Endothelprogenitorzellen ohne Verlust des Differenzierungspotenzials ex-vivo expandiert werden konnten (s. Schema in Abbildung 1).

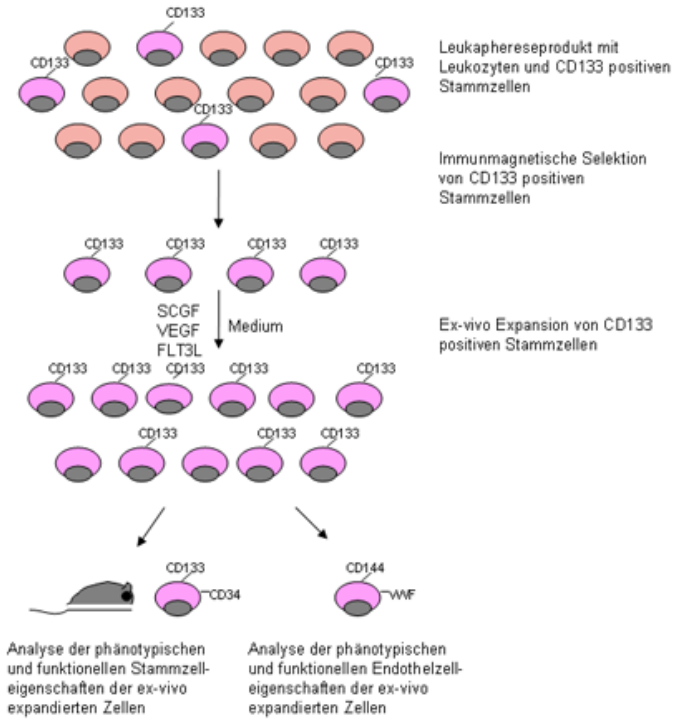

Abbildung 1: Aufreinigung, Expansion und funktionelle sowie phänotypische Analyse der CD133$^+$ Zellen.

Anschließend wurde untersucht, ob sich die expandierten CD133$^+$ Zellen morphologisch und phänotypisch in Endothelzellen differenzieren konnten. Dazu wurden diese Zellen ausschließlich mit VEGF weiterkultiviert. Das führte dazu, dass ein Teil der Zellen adhärent wurde und eine endotheliale Morphologie annahm. Adhärente und nicht adhärente Zellen exprimierten zu 100% die endothelialen Zelloberflächenmoleküle Ulex europaeus Rezeptor, vWF und VE-Cadherin.

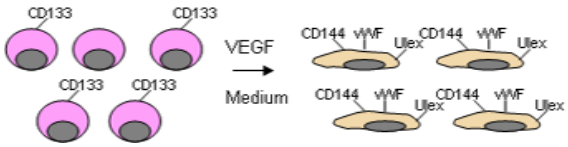

Abbildung 2: Analyse der Differenzierungskapazität der ex-vivo expandierten Stammzellen in reife Endothelzellen.

So wurde gezeigt, dass ausreichende Mengen an autologen Endothelzellen für den klinischen Einsatz, z.B. für Patienten mit Herzinfarkt oder Durchblutungsstörungen, gewonnen werden konnten. Der experimentelle Ansatz ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die proliferierenden $CD133^+$ Zellen retroviral mit dem grün fluoreszierenden Markergen eGFP transduziert. Mit Hilfe dieser Markierung konnte auf Einzelzellebene untersucht werden, ob diese Zellpopulation Stammzellen enthielt, die sich sowohl in hämatopoetische als auch in endotheliale Zellen differenzieren konnten.

Dazu wurden ex-vivo Expansionskulturen einzelner GFP-positiver Zellen angelegt. Deren Nachkommen wurden aufgeteilt und je eine Hälfte des Klons endothelial bzw. hämatopoetisch differenziert. Mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz, der Analyse der Kernmorphologie mit einem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff sowie von Zelloberflächenmarkern mit rot-fluoreszierenden Antikörpern wurden Granulozyten und Endothelzellen als Nachkommen einer Ursprungszelle identifiziert (s. Schema in Abbildung 3).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die expandierte Zellpopulation postnatale Hämangioblasten in einer Frequenz von 1,8% enthielt.

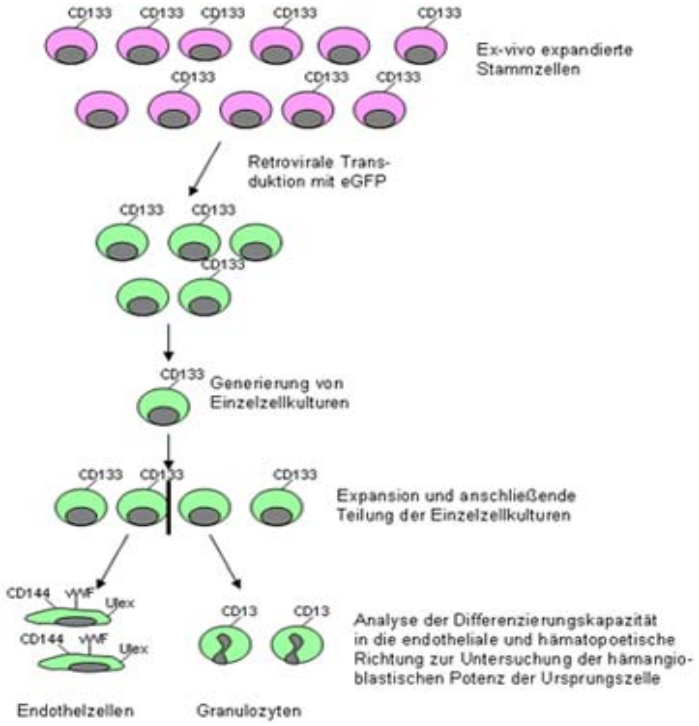

Abbildung 3: Analyse der hämangioblastischen Potenz der ex-vivo expandierten Stammzellen.