



1. Einleitung

1.1. Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die sich laut Definition immer wieder erneuern und in mehr als ein Gewebe differenzieren können. Unterschieden werden embryonale und adulte Stammzellen (Ramalho-Santos, Yoon et al. 2002). Embryonale Stammzellen können sich zu einem kompletten Organismus und/oder sämtliche Gewebe entwickeln, d.h. sie sind omnipotent. Adulte Stammzellen hingegen, die sich in bestimmten Organen befinden, sind pluripotent und können sich nur zu einer begrenzten Anzahl an Geweben entwickeln.

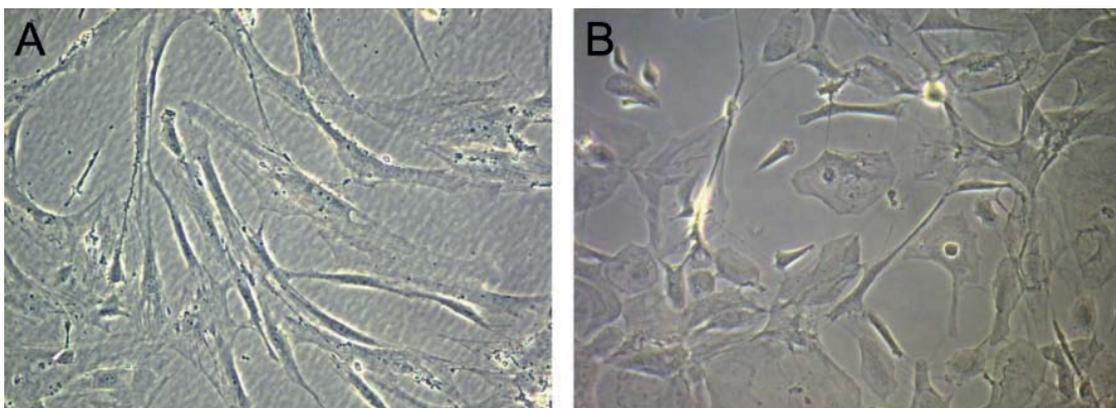


Abbildung 1.1: Humane (A) und Ratten MSC (B).



1.1.1. Mesenchymale Stammzellen

Die mitunter bekanntesten Stammzellen sind die hämatopoietischen Stammzellen, die ein Leben lang für die Blutbildung zuständig sind (Kawamoto, Wada et al.). Eine weitere, den adulten Stammzellen angehörende Zellpopulation stellen die Mesenchymalen Stammzellen dar. Auf Mesenchymale Stammzellen (MSC, von engl.: *mesenchymal stem cells*), wurde erstmals 1968 von Friedenstein hingewiesen, nachdem ihm die Identifizierung einer von der Blutbildung unabhängigen Population mesenchymaler Vorläuferzellen im Knochenmark gelang (Friedenstein, Petrakova et al. 1968). Mesenchymale Stammzellen, die auch als Stromazellen bezeichnet werden, sind nicht-hämatopoietische Stammzellen und machen etwa 0,01-0,05 % der Zellpopulation des Knochenmarks aus. Überwiegend kommen sie im Mikromillieu des Knochenmarks adulter Säuger vor, ein geringer Teil zirkuliert frei im Blut (Roufosse, Direkze et al. 2004). Weitere Quellen sind Fettgewebe, aus denen sich die sog. Adipose-tissue-derived MSC gewinnen lassen (Zuk, Zhu et al. 2001; Strem, Hicok et al. 2005; Kern, Eichler et al. 2006), die Nabelschnur (Erices, Conget et al. 2000; Goodwin, Bicknese et al. 2001) oder Fruchtwasser und Plazenta (Steigman und Fauza 2007); (Tsai, Lee et al. 2004). Unter physiologischen Bedingungen verweilen MSC inaktiv im Mikromillieu, stimuliert hingegen, z.B. durch Ischämie oder Trauma, migrieren sie zu peripheren mesenchymalen Geweben und werden funktional aktiv, indem sie zur Geweberegeneration beitragen. Auf die bisher untersuchten Mechanismen, die die Mobilisierung einleiten, wird noch genauer eingegangen.

Die bis heute gängige Isolationsmethode beruht auf der Eigenschaft der MSC, in Kultur im Vergleich zu anderen im Knochenmark vorkommenden Zellpopulationen, nach etwa 24 h Kultivierung des Knochenmarks oberflächenadhärent zu werden. Adhärent besitzen die Zellen eine spindelförmige Morphologie (Abbildung 1.1) und beginnen, klonal zu expandieren (Haynesworth, Goshima et al. 1992).

In vitro haben MSC die Fähigkeit, zu nahezu allen Zellen zu differenzieren, die den drei Keimblättern entstammen (Pereira, Halford et al. 1995). Im Organismus reifen MSC zu mesodermalen Zellen, die wiederum Vorläuferzellen von Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten oder Zellen der Skelettmuskulatur sind (Abbildung 1.2). Es gelang die *in*

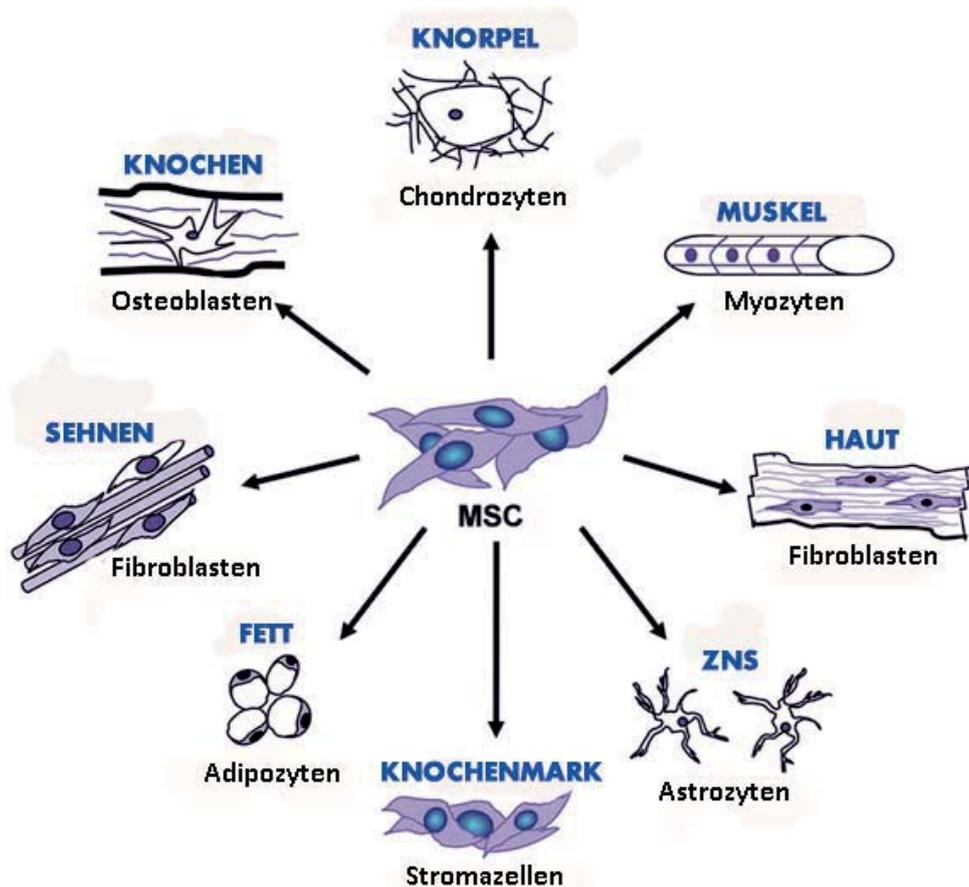


Abbildung 1.2: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in verschiedene Zelltypen und Gewebe. Verändert nach Grassel und Ahmed 2007.

in vitro Differenzierung zu Leber- oder Pankreaszellen (Chen, Jiang et al. 2004; Lange, Bruns et al. 2006), als auch Endothelzellen (Caplan und Bruder 2001), die Zellen des Endoderms als Vorläufer haben und Transdifferenzierungen zu Neuronen (Jiang, Jahagirdar et al. 2002). Phänotypische Charakterisierungen *ex vivo* expandierter MSC zeigen die Expression einer Reihe unspezifischer Marker, wie z.B. CD105 (SH2 oder Endoglin), CD73, CD90, CD166, CD44 und CD29 (Pittenger, Mackay et al. 1999; Deans und Moseley 2000), jedoch fehlen ihnen hämatopoietische und endotheliale Marker wie CD11b, CD14, CD31 und CD45. Auch co-stimulatorische und MHC Klasse II-Moleküle werden nicht und MHC Klasse I-Moleküle nur in geringer Dichte exprimiert, die Expression wird aber durch inflammatorische Stimuli erhöht, wie an humanen MSC gezeigt wurde (Tse, Pendleton et al. 2003).



FACS Marker	Humane MSC	Murine MSC	Ratten MSC
CD11b (Integrin α M) ¹	-	-	-
CD13 (Aminopeptidase N) ²	+	+/-	Nicht bestimmt
CD29 (Integrin β 1) ³	++	++	++
CD31 (PECAM-1) ⁴	+/-	-	-
CD34 (Adhesion rp) ⁵	-	+/-	-
CD44 (Pgp1) ⁶	++	++	++
CD45 (Leukocyte antigen) ⁷	-	-	-
CD73 (SH3/4) ⁸	++	0	++
CD90 (Thy-1) ⁹	++	+/-	++
CD105 (SH2,TGF- β Rp) ¹⁰	++	+	+
CD106 (VCAM-1) ¹¹	++	+	+/-
CD117 (c-kit) ¹²	+/-	-	+/-
Stro-1 (Stromal antigen 1) ¹³	+	+	+
Flk-1 (VEGFR-1) ¹⁴	+/-	-	+
Sca-1 (Stem cell antigen 1) ¹⁵	-	+/-	*

Tabelle 1.1: FACS Marker für humane, Maus- und Ratten-MSK. *kein Antikörper gegen Ratte verfügbar, (+) in mindestens einer Studie belegt; (++) in mehreren Studien belegt, (+/-) in mindestens einer Studie belegt oder nicht belegt.

¹Pittenger, Mackay et al. 1999; Colter, Sekiy et al. 2001; Peister, Mellad et al. 2004; Chamberlain, Fox et al. 2007; Schäfer, Ayturan et al. 2008

²Vogel, Grunebach et al. 2003; Copland, Sharma et al. 2008

³Pittenger, Mackay et al. 1999; Schäfer, Ayturan et al. 2008

⁴Colter, Sekiya et al. 2001; Peister, Mellad et al. 2004; Chamberlain, Wright et al. 2008; Schäfer, Ayturan et al. 2008

⁵Baddoo, Hill et al. 2003; Chamberlain, Wright et al. 2008; Copland, Sharma et al. 2008; Danielyan, Schäfer et al. 2009

⁶Pittenger, Mackay et al. 1999; Chamberlain, Fox et al. 2007; Schäfer, Ayturan et al. 2008

⁷Pittenger, Mackay et al. 1999; Peister, Mellad et al. 2004; Schäfer, Ayturan et al. 2008; Danielyan, Schäfer et al. 2009

⁸Pittenger, Mackay et al. 1999; Chamberlain, Fox et al. 2007; Schäfer, Ayturan et al. 2008

⁹Pittenger, Mackay et al. 1999; Colter, Sekiya et al. 2001; Schäfer, Ayturan et al. 2008

¹⁰Chamberlain, Wright et al. 2008; Schäfer, Ayturan et al. 2008

¹¹Peister, Mellad et al. 2004; Schäfer, Ayturan et al. 2008; Barzilay, Sadan et al. 2009

¹²Colter, Sekiya et al. 2001; Abdi, Fiorina et al. 2008; Schäfer, Ayturan et al. 2008

¹³Simmons und Torok-Storb 1991; Chamberlain, Fox et al. 2007

¹⁴Colter, Sekiya et al. 2001; Peister, Mellad et al. 2004; Abdi, Fiorina et al. 2008; Copland, Sharma et al. 2008

¹⁵Peister, Mellad et al. 2004; Abdi, Fiorina et al. 2008

Blutgruppenantigene und GD2

Trotz der geringen Immunogenität von MSC, ist bei Pavianen eine alloreaktive Immunantwort beobachtet worden, nachdem in bestimmten Intervallen hohe Dosen allogener MSC verabreicht wurden. In einem weiteren Transplantationsmodell zeigte sich an Mäusen nach Co-Transplantation allogener MSC mit Knochenmark ein verringertes Entgraftment, als in der Gruppe, der autologe MSC mit Knochenmark co-transplantiert wurden, dazu wurde eine Immunantwort durch memory T-Zellen ausgelöst (Beggs, Lyubimov et al. 2006; Nauta, Westerhuis et al. 2006). Nur wenige Studien haben sich bisher der Untersuchung zur Expression von Blutgruppenantigenen auf MSC zugewandt (Sundin, Ringden et al. 2007). Er untersuchte auf hMSC mittels Durchflusszytometrie die Expression von A- und B-Antigenen von je drei Donoren mit den Blutgruppen A und B, die Antigene wurden auf der Oberfläche der MSC im Rahmen der Untersuchung nicht detektiert. Genauere Untersuchungen sind notwendig, da eine durch das Vorhandensein der Blutgruppenantigene entstehende Immunogenität ihren therapeutischen Nutzen und ihre klinische Verträglichkeit in Frage stellen kann, insbesondere zur Therapie von Autoimmunerkrankungen. Die Immunisierung des Spenders könnte außerdem ein verringertes Entgraftment oder eine Abstoßung des Transplantats zur Folge haben und eine immunsuppressive Behandlung notwendig machen.

Die Schwierigkeit, einen spezifischen Marker für MSC zu identifizieren, führte zu einer inhomogenen Klassifizierung von Subpopulationen. Für eine MSC (Sub-)Population können u.a. neben den o.g. Markern auch CD271, W8B2, SSEA-4, CD340, CD349, CDCP1 (Bühring, Kuci et al. 2004; Bühring, Battula et al. 2007), CD49a, W7C5 (Deschaseaux, Gindraux et al. 2003; Giesert, Marxer et al. 2003) infrage kommen. Das neurale Disialogangliosid GD2 wurde zunächst auf Tumoren neuroektodermalen Ursprungs gefunden, im Knochenmark wird dieses Molekül insbesondere auf MSC exprimiert (Quirici, Soligo et al. 2002; Giesert, Marxer et al. 2003; Bühring, Kuci et al. 2004; Martinez, Hofmann et al. 2007). Da GD2 eine relativ genaue Identifizierung einer Subklasse von MSC ermöglicht, wird er im Rahmen der Arbeit in Kombination mit Antikörpern gegen das zu identifizierende Blutgruppenantigen H verwendet.



1.1.2. Weitere Stammzellklassen

Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen bilden das Blut- und Immunsystem. Im Gegensatz zu MSC gehören hämatopoetische Stammzellen der Gruppe multipotenter Progenitorzellen an, die myeloide oder lymphoide Zellen bilden (Golden-Mason, Curry et al. 2000). Lymphoide Zellen differenzieren zu B-, T- und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die myeloiden Progenitorzellen transformieren zu eosinophilen, basophilen und neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten, dendritischen Zellen und Erythrozyten (Mikkola und Orkin 2006; Hahn, Kaufmann et al. 2009).

Die Population der HSC ist wie die der MSC heterogen, und es werden verschiedene Subtypen beschrieben. HSC teilen sich relativ langsam und durchlaufen während ihrer Differenzierung mehrere Vorläuferstadien von multi-, oligo- zu unipotenten Zellen, die sich nur noch in eine Linie entwickeln können (Abbildung 1.3). Sie können einerseits direkt aus dem Knochenmark gewonnen werden oder durch Stimulation mit dem Zytokin G-CSF (engl.: *granulocyte colony stimulating factor*) zur Migration aus dem Knochenmark in das Blut angeregt werden (Sohn, Kim et al. 2002). Eine kleine Population zirkuliert frei im Blut (Gallacher, Murdoch et al. 2000). Weitere Quellen sind Nabelschnurblut, die Plazenta (Cairo und Wagner 1997; Robin, Bollerot et al. 2009), sowie fetales Leber-, Thymus- oder Milzgewebe (Sharma, Pati et al. 1997). Durch Stress, Entzündungen oder Verletzungen werden HSC zur Mobilisierung angeregt und migrieren aus der Nische im Knochenmark zum Zielort, wo sie differenzieren (Lapidot und Petit 2002). Die HSC haben die Möglichkeit, wieder in das Knochenmark einzuwandern, indem sie mit der luminalen Oberfläche des Knochenmark-Venolen und des sinusoidalen Endotheliums interagieren (Mazo und von Andrian 1999). Die Passage der Endothelbarriere wird vor allem durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen, deren Signalwege zur Durchlässigkeit der Barriere für HSC führen, ermöglicht. Zu diesen Molekülen zählen z.B. VLA-4, VLA-5, CD31 und verschiedene Selektine (Simmons, Levesque et al. 1997).

Die selektive Isolierung aus den o.g. Geweben erfolgt durch Cell sorting oder MACS mithilfe von Antikörpern gegen typische Oberflächenmoleküle, z.B. c-kit, CD133 oder CD34, einem Marker der allerdings nur auf den Long-term HSC, der am wenigsten differenzierten Gruppe von HSC noch nicht exprimiert wird.

Weitere Oberflächenmoleküle sind Sca-1, Thy1 (CD90) (Spangrude, Heimfeld et al. 1988), CD45, CD150, CD201. Während CD34 auf humanen HSC nachgewiesen werden kann, fehlt er auf murinen HSC oder wird nur in geringer Menge exprimiert. Bei dem Marker CD38 verhält es sich umgekehrt. In beiden Systemen wurde lin- beschrieben, HSC besitzen demzufolge keine Marker, die einen Rückschluss auf die sich entwickelnde Zelllinie gibt, wie beispielsweise CD19 für B-Zellen, CD3 bis 5 und CD8 für T-Zellen, Mac-1 für Monozyten oder CD61 für Megakaryozyten. Die Färbung von LT-HSC mit Rhodamin123 fällt, verglichen mit anderen Zelltypen, schwach aus, was auf eine geringe metabolische Aktivität hindeutet. Rh-123 färbt Mitochondrien mit zunehmender Intensität, die proportional zur zellulären Aktivität ist (Kim, Cooper et al. 1998).

Die isolierten Zellen ähneln morphologisch Lymphozyten. Sie adhären nicht und weder die Aufrechterhaltung des Stammzellzustandes noch eine *ex vivo* Expansion sind bisher erfolgreich gelungen. Vermutlich benötigen sie das Umfeld anderer „Nischenzellen“ des Knochenmarks für optimale Funktionalität.

Nachdem viele Jahre davon ausgegangen wurde, dass HSC aus einem einzigen Zelltypen hervorgehen, sind kürzlich Subtypen beschrieben worden. Challen zeigte in einer 2010 veröffentlichten Studie, dass die Entwicklung zu myeloiden oder lymphoiden Zellen offenbar unter Einfluss von TGF- β 1-gesteuerten Signalwegen steht. Myeloide HSC proliferieren in Gegenwart von TGF- β 1, lymphoide HSC dagegen stellen ihr Wachstum ein. Die Gene *p18* und *p19*, Inhibitoren des G0/G1 Zellzyklus werden unter TGF- β 1 bei myeloiden HSC inhibiert (Challen, Boles et al.).

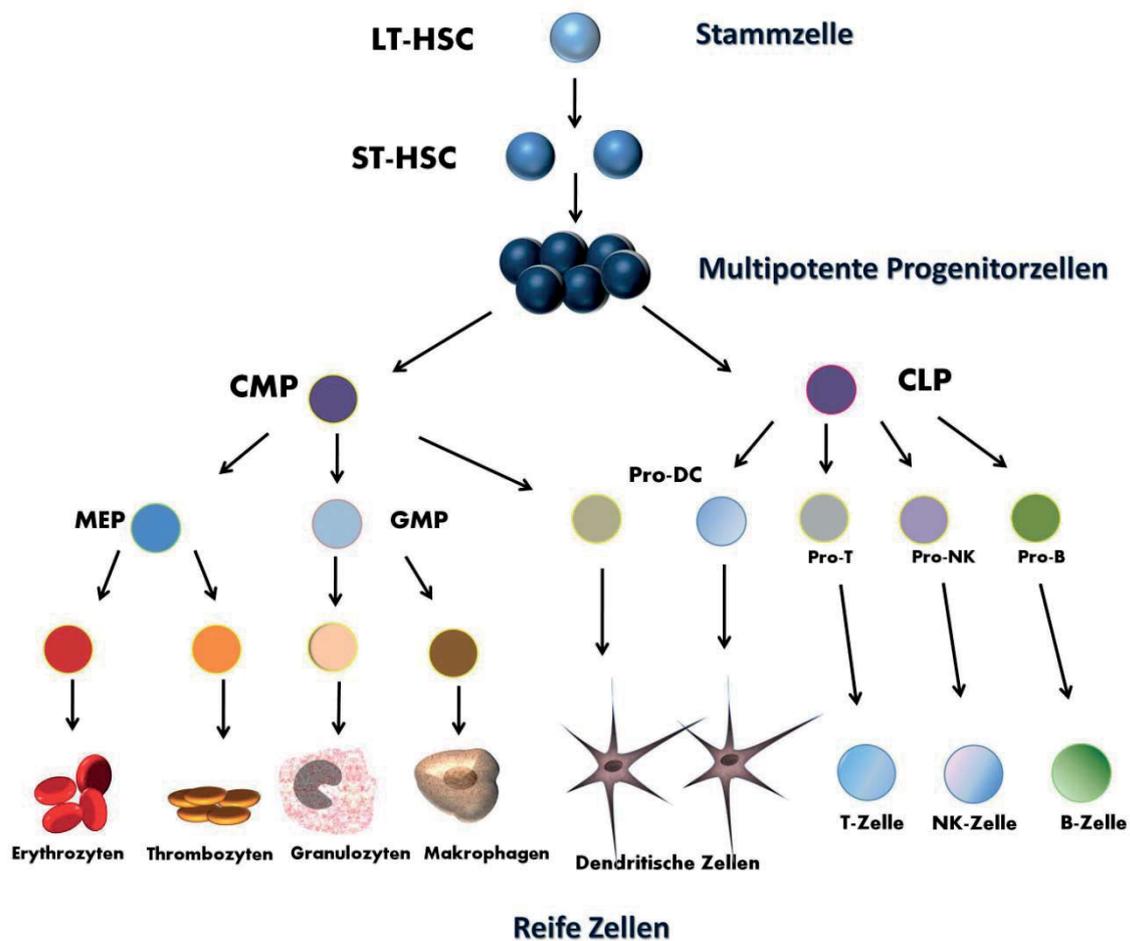


Abbildung 1.3: HSC lassen sich in LT-HSC (long term) Zellen unterteilen, die sich selbst erneuern können und die Hämatopoese ein Leben lang rekonstruieren, aber auch in solche, die sich nur in einer begrenzten Zeit selbst erneuern ST-HSC (short term) (Chumsri, Matsui et al. 2007). ST-HSC differenzieren sich in multipotente Progenitorzellen (MPP), die keine Selbsterneuerung mehr aufweisen, aber in der Lage sind einen irreversiblen Differenzierungsschritt, bis hin zu ausgereiften Zellen, auszuführen. Aus lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) gehen T- und B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen hervor, während sich myeloide Progenitorzellen (CMP) in Myelomonocyten Progenitorzellen (GMP) mit Monozyten/Makrophagen und Granulozyten und in Megakaryozyten/Erythroiden Progenitoren (MEP) differenzieren. MEP produzieren dabei Thrombozyten und Erythrozyten. Sowohl CMPs, als auch CLPs bewirken eine Differenzierung in Dendritische Zellen. Diese Stamm- und Progenitorzellpopulationen können als eigenständige Population mit Hilfe von Zelloberflächenmarkern bestimmt werden.

Therapien/Klinische Anwendung

HSC kommen vor allem in der Therapie eines nicht intakten hämatopoetischen Systems zum Einsatz. So werden HSC beispielsweise im Rahmen der Krebstherapie bei einigen Krebsarten wie Leukämien und Lymphomen verwendet (Bosly, Gisselbrecht et al. 1993; Kharfan-Dabaja, Anasetti et al. 2007; Delgado, Milligan et al. 2009). Die Therapie mit HSC wird nach Bestrahlungen oder hoch dosierten Chemotherapien (myeloablative Chemotherapie) eingesetzt, da bei diesen Behandlungen als unerwünschte Nebenwirkung häufig auch das Knochenmark geschädigt wird (Link 1997). Die dadurch bedingte Störung der Blutbildung kann ohne einen Ersatz teilungsfähiger Knochenmarkszellen zur Anämie, d.h. zum Verlust der roten Blutkörperchen, der weißen Blutkörperchen (Leukozytopenie) (Jereezek, Jassem et al. 1996) und der Blutplättchen (Thrombozytopenie) (Vadhan-Raj 2009) führen. Dieser Mangel ist lebensgefährlich, weil dadurch die Immunabwehr, die Sauerstoffversorgung und die Blutgerinnung eingeschränkt sind. Die Stammzelltransplantation ersetzt rasch die fehlenden Blut- und Immunzellen und es kann eine vorübergehende Krankheitsfreiheit und in vielen Fällen auch eine vollständige Heilung erreicht werden. In verschiedenen Studien wurde die Induktion der Immuntoleranz gezeigt (Burt, Slavin et al. 2002). Die Behandlung nicht potenziell lebensbedrohlicher Autoimmunerkrankungen wie MS ist allerdings wegen der relativ hohen behandlungsbedingten Sterblichkeitsrate vor allem nach allogener, aber auch nach autologer ($\geq 5\%$) Transplantation umstritten. Dennoch wurde von Richard Burt im Rahmen einer Phase I/II Studie geringeren Umfangs gezeigt, dass sich das Fortschreiten der schubförmig-remittierenden MS nach non-myeloablativer, autologer Stammzelltherapie mit HSC durchaus verlangsamen kann (Burt, Loh et al. 2009). Die Stammzellen wurden zunächst mit Cyclophosphamid und Filgrastim mobilisiert, anschließend wurde das aggressive Immunsystem wie bei der Krebstherapie durch Chemotherapie zerstört und durch ein neues ersetzt. Ob HSC tatsächlich nützlich sind, bleibt offen, denn der Studie fehlte die Vergleichsgruppe.

Auch hämatopoetische Stammzellen der Nabelschnur werden bereits in der Klinik verwendet. Das Engraftment der Zellen ist allgemein geringer, der Vorteil liegt in der geringeren Inzidenz von GvHD-Fällen (Laughlin, Barker et al. 2001).



Neurale Stammzellen

Die subventrikuläre Zone oder der Hippocampus sind Beispiele für Bereiche, die proliferierende Zellen enthalten (Song, Stevens et al. 2002; Merkle, Tramontin et al. 2004). Sie werden auch als endogene Stammzellen des Nervensystems bezeichnet. Wie aus dem fetalen Hirn, das eine größere Zahl von Arealen sich teilender Zellen enthält, können diese Zellen isoliert und *in vitro* expandiert werden. Aufgrund ihres Differenzierungspotenzials zu Oligodendrozyten, Astrozyten oder Neurone (Clarke, Johansson et al. 2000; Gage 2000; Levison, Druckman et al. 2003) sind diese Zellen therapeutisch für den Zellersatz bei neurodegenerativen Erkrankungen wie MS oder Parkinson vielversprechend. Auch im Rahmen von Gentherapien und zur Behandlung von Hirntumoren wie maligne Gliome oder Neuroblastomen sollen sie zum Einsatz kommen, da sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur Migration und eine starke Affinität zu malignen Gliomen, bzw. deren Wachstumsfaktoren haben (Ehtesham, Kabos et al. 2002). Die Migration kann sowohl *in vitro* durch SF/HGS stimuliert werden (Heese, Disko et al. 2005), als auch *in vivo* (Schmidt, Przylecki et al. 2005) mit VEGF. Nicht nur intracerebral, sondern auch i.v. appliziert, wanderten die neuralen Stammzellen zu Tumoren neuralen Ursprungs (Brown, Yang et al. 2003). Werden sie i.v. verabreicht, wandern sie im Falle anderer Tumorerkrankungen auch zum entsprechenden Tumor wie die Gruppe um Aboody 2006 zeigte (Aboody, Najbauer et al. 2006). Die Zellen wanderten ebenfalls zu einem Prostata-Karzinom des Patienten.

Induzierte, pluripotente Stammzellen

Eine Besonderheit stellen induzierte, pluripotente Stammzellen (*engl.: induced pluripotent stem cells*) dar. Vor allem MSC werden verwendet um sog. Reprogrammierungen adulter Zellen in pluripotente Zellen zu entwickeln (Yan, Qin et al.). Sie wurden 2007 von Shinya Yamanaka von der Universität Kyoto beschrieben. Er entwickelte Methoden zur Reprogrammierung adulter Mausfibroblasten in deren embryonalen, pluripotenten Zustand. Später gelang ihm dies auch bei humanen Fibroblasten (Takahashi und Yamanaka 2006; Takahashi, Tanabe et al. 2007). Sie werden hierzu mithilfe von Retro- oder Lentiviren genetisch durch die Integration von bis zu vier Transkriptionsfaktoren wie Oct3/4, Sox2, klf4, Nanog oder Lin28 und c-myc modifiziert (Wernig, Meissner et al. 2007). Die Gruppe um George Daley von der Harvard Medical School zeigte im selben