

Aktivitäten des Labors für Interdisziplinäre Stammzellforschung

(Leitung: Prof. Dr. rer.physiol. Günther Eißner)

MitarbeiterInnen: Dr. rer.nat. Petra Stroh (Postdoc), M.Sc. Trixi Hollweck (Doktorandin), Dipl.Biol. Isabel Hartmann (Doktorandin), Silvia Haffner (MTA), Tanja Sax (BTA), Daniel Dimanski (BTA), Bachelor-Studenten, Praktikanten, Medizinische Doktoranden



Das Labor für Interdisziplinäre Stammzellforschung der Herzchirurgischen Klinik, das seine Arbeit zunächst als Else-Kröner-Fresenius-Stiftungsprofessur zum 01.01.2008 aufgenommen hatte, beschäftigt sich mit mesenchymalen (MSC) und hämatopoetischen (HSC) Stammzellen der Nabelschnur. Untersucht werden u. a. das Differenzierungspotential (Plastizität) dieser Stammzellen für den Einsatz in der regenerativen Medizin und Ansätze zur Toleranzinduktion bei adjuvanter Immuntherapie sowie die in vitro Expansion der HSC zur Vergrößerung des Patientenkreises, der für eine Leukämiebehandlung in Frage kommt (siehe Programmschema in Abb. 1).

Darüber hinaus stellt das Labor Untersuchungen zur Endothelpathologie in der Transplantationsmedizin an. Hier liegen einschlägige prä-klinische Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Rolle der prä-Transplant-Konditionierung für Schaden¹, Aktivierung² und Allogenität^{3:4} des Endothels, inklusive einer Risikostratifizierung⁵, sowie zur prophylaktischen und therapeutischen Interferenz^{4:6:7} vor (Abb. 2).

Ein weiterer Schwerpunkt, der unlängst zu den Forschungsaktivitäten des Labors hinzu kam, ist die Generierung Protein-induzierter pluripotenter Stammzellen (p-iPSC)⁸, die ebenfalls in der regenerativen Medizin eingesetzt werden sollen.

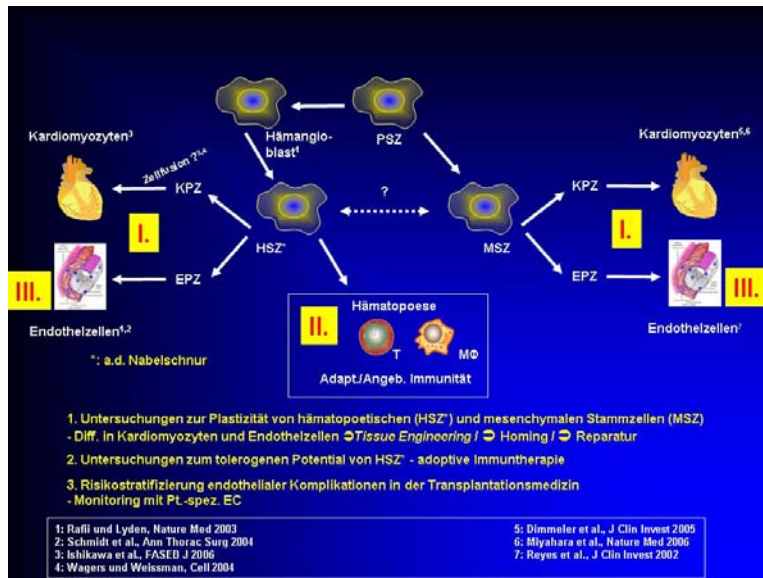


Abb. 1: Zusammenfassung der Forschungsaktivitäten des Labors für Interdisziplinäre Stammzellforschung der Herzchirurgischen Klinik der Universität München

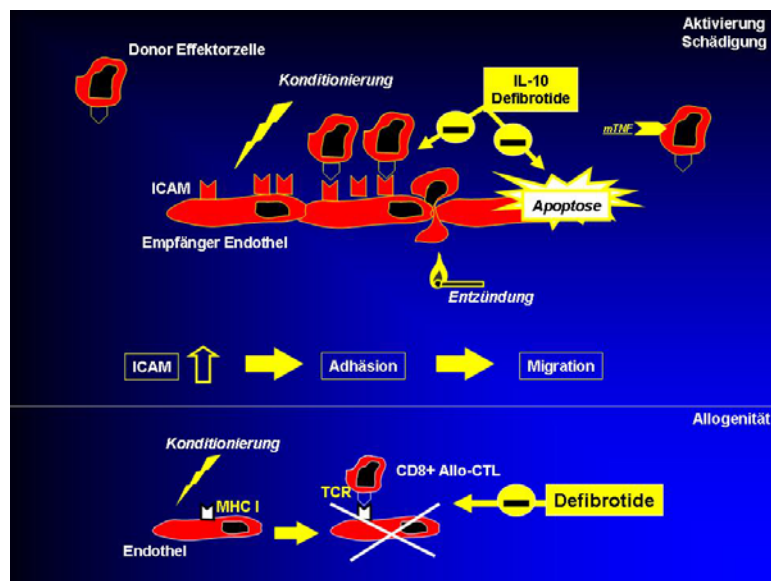


Abb. 2: Das vaskuläre Endothel wird unter der Konditionierung vor Transplantation durch Apoptose geschädigt, gleichzeitig pro-inflammatorisch aktiviert und in seiner Antigenität gegenüber allo genen immunologischen Effektorzellen erhöht.

Die Nabelschnur bietet neben den hämatopoetischen Stammzellen noch weitere differenzierungsfähige mesenchymale Stroma- oder Stammzellen, die im perivaskulären Gewebe oder auch der Wharton'schen Sulze lokalisiert sind (Abb. 3). Die Zellen können ohne massiven experimentellen Aufwand isoliert werden⁹ und können ebenfalls in Kardiomyozyten¹⁰ und Endothelzellen¹¹ sowie in Hepatozyten¹² differenzieren. Gegenüber den mesenchymalen Stammzellen des Nabelschnurblutes haben diese

Zellen den Vorteil, dass sie besser kryokonservierbar sind und ein sehr geringes immunogenes Potential aufweisen. Darüber hinaus eignen sie sich zur ex vivo Expansion von hämatopoetischen Stammzellen¹³. Eine interessante Fragestellung für das Stammzell-Labor wird sein, in wie weit diese Stammzellen immunregulatorische Funktion in Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen übernehmen können.

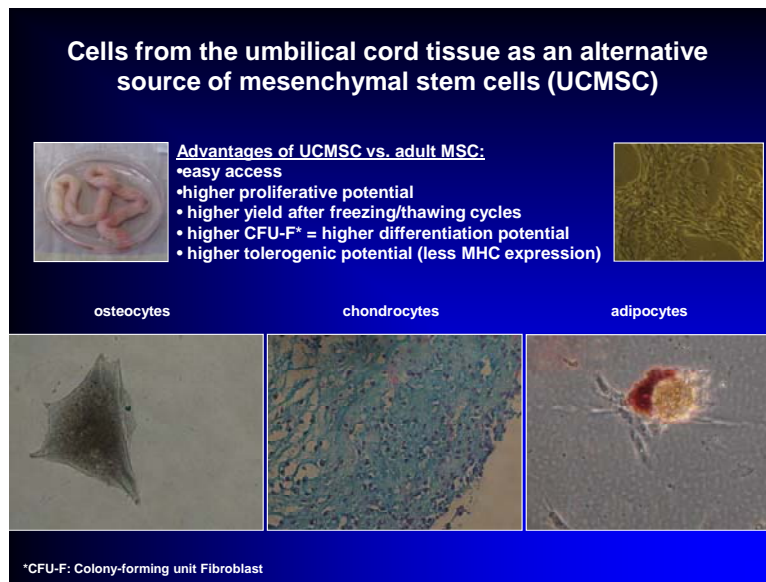


Abb. 3: Mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe als alternative Stammzellquelle in der regenerativen Medizin.

In der Zwischenzeit ist es unserem Labor gelungen, UCMSC unter Bedingungen guter Herstellungspraxis (GMP-konform) zu kultivieren und den Mechanismus der Immunsuppression allogener gemischter Lymphozytenreaktionen (MLR) aufzuklären.¹⁴ Im Bereich der regenerativen Medizin wurden verschiedene biokompatible Gerüststrukturen mit kardiomyogen differenzierten UCMSC (cUCMSC) erfolgreich besiedelt¹⁵ und stehen nun für prä-klinische in vivo Studien (experimenteller Myokardinfarkt im Nagermodell) zur Verfügung. Darüber hinaus wurde ein systematischer Vergleich publizierter Protokolle zur Kardiodifferenzierung von Stammzellen angestellt sowie das effektivste Protokoll verifiziert und optimiert (Abb. 4, Hollweck et al, Manuskript eingereicht).

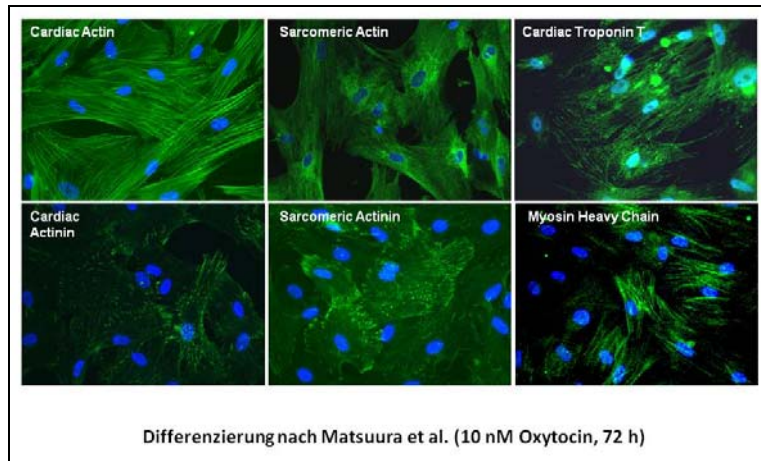


Abb. 4: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit Oxytocin differenzierter cUCMSC, nukleäre Gegenfärbung mit DAPI; Vergr. 400x.

Über einen mit der Herztransplantationsambulanz über ein Bereitschaftshandy vernetzten 24/7 Schichtdienst werden frische Herzexplantatproben nach Herztransplantation gewonnen und in Kultur genommen. Die auswachsenden Herzstammzellen werden phänotypisch und funktionell charakterisiert und auf ihre Interaktion mit UCMSC untersucht.

Wie bereits erwähnt beschäftigt sich die Arbeitsgruppe auch mit der Modulation Endothel-spezifischer zytotoxischer Reaktionen durch regulatorische T-Zellen. $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}) gelten als aussichtsreiche Kandidaten bei der Toleranzentwicklung in der soliden und allogenen Stammzelltransplantation. Auf der Basis eigener Vorarbeiten, die die Rolle von Endothelzellen als Antigen-präsentierende Zellen (APC) untersucht hatten^{3,4,16}, stellten wir die Frage, in welcher Weise T_{reg} Endothel-spezifische T-Zell-Antworten beeinflussen würden. $CD8^+$ T-Zellen wurden zur Etablierung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) aus Apherisaten durch immunmagnetische Partikel negativ selektiert („*untouched*“) und mit allogenen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) für 7 Tage stimuliert. An d6 der Stimulation wurden T_{reg} zugegeben. Überraschender zeigte sich in einem Standard- ^{51}Cr -Freisetzungstest, dass die Zugabe von T_{reg} zu den CTL zu einer verstärkten Lyse der HMEC führte (Abb. 5). Die Kostimulation der CTL mit $CD25$ -negativen T-Zellen hatte keinen Einfluss.

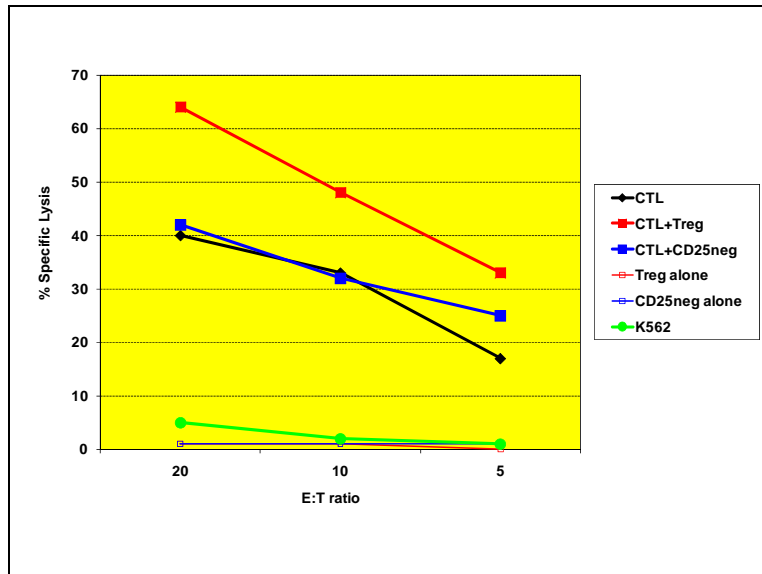


Abb. 5: T_{reg} verstärken die Lyse humaner mikrovaskulärer Endothelzellen durch allogene $CD8^+$ CTL. ^{51}Cr -Freisetzungstest mit HMEC und K562-Zellen als Targets.

Diese ungewöhnliche Reaktion deckte die Existenz Endothel-spezifischer CD28-negativer CTL auf, die durch T_{reg} in ihrer Aktivität verstärkt werden (Eißner et al., Manuskript eingereicht).

Methodisch ist die Arbeitsgruppe neben Standardverfahren (Zellkultur, Western Blot, Durchflusszytometrie, ELISA, etc.) durch die Möglichkeit, Endothelzellen unter Fluss-/Scherstressbedingungen untersuchen und computer-gestützte Videomikroskopie (*Live Cell Imaging*) durchführen zu können (Abb. 6), gut ausgerüstet. Es sind u.a. umfangreiche Untersuchungen zum chemotaktischen Verhalten der differenzierten Stammzellen vorgesehen. Die apparative Ausstattung und entsprechende Software erlauben die Beobachtung und Quantifizierung von gerichteter Migration auf Einzelzellebene.

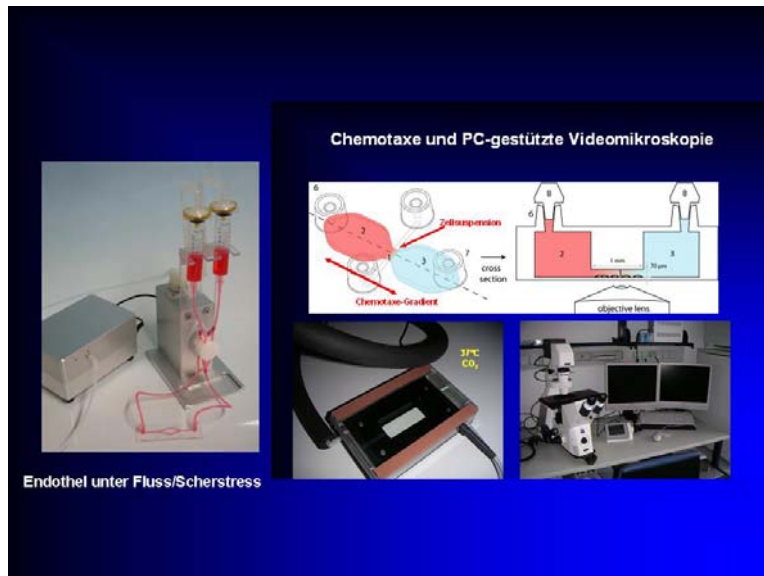


Abb. 6: Teil der apparativen Ausstattung des Labors für Interdisziplinäre Stammzellforschung.

Drittmittelförderung:

Else-Kröner-Fresenius-Stiftung, Stiftung Aktion Knochenmarkspende Bayern, BMBF, Bayerische Forschungstiftung, DFG (beantragt)

Kooperationen innerhalb der Herzchirurgischen Klinik: Dr. med. A. Beiras Fernandez (Immunsuppression und Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen), Dr. med. K. Januszewska (PTFE Prothesen und Endothelbesiedelung), Dr. ing. B. Akra (PTFE-Besiedelung mit Stammzellen), DFG-Transregio-Forschergruppe Xenotransplantation (Allo-/Xenogenität des Endothels, Endothelschutz)(SFB-Initiative geplant)

Kooperationen außerhalb der Herzchirurgischen Klinik: Diabetes-Zentrum Medizinische Klinik Innenstadt, LMU München (Prof. Dr. J. Seißler); Fa. Apceth GmbH & Co. KG (Dr. C. Günther); Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Universität Würzburg (Prof. Dr. H. Walles); Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie (Prof. Dr. G. Multhoff) sowie Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung (Dr. B. Eißner) am Klinikum rechts der Isar, TU München; Kansas State University, Manhattan, KS, USA (Prof. Dr. M.L. Weiss); Prof. Dr. H.J. Kolb (Klinikum rechts der Isar, TU München; Abteilung Hämatologie/Onkologie, Klinikum der Universität Regensburg (Prof. Dr. E. Holler); Lehrstuhl für Medizintechnik, TU München (Prof. Dr. E. Wintermantel).



Reference List

1. Eissner G, Kohlhuber F, Grell M et al. Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor- α in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood* 1995;86:4184-4193.
2. Eissner G, Lindner H, Behrends U et al. Influence of bacterial endotoxin on radiation-induced activation of human endothelial cells in vitro and in vivo: protective role of IL-10. *Transplantation* 1996;62:819-827.
3. Eissner G, Multhoff G, Holler E. Influence of bacterial endotoxin on the allogenicity of human endothelial cells. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21:1286-1288.
4. Eissner G, Multhoff G, Gerbitz A et al. Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. *Blood* 2002;100:334-340.
5. Ganster A, Brucker I, Holler E et al. In vitro monitoring of endothelial complications following hematopoietic allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33:355-357.
6. Koehl GE, Geissler EK, Iacobelli M et al. Defibrotide: An Endothelium Protecting and Stabilizing Drug, has an Anti-Angiogenic Potential In Vitro and In Vivo. *Cancer Biol Ther* 2007;6:686-690.
7. Gottfried E, Kreutz M, Haffner S et al. Differentiation of Human Tumour-associated Dendritic Cells into Endothelial-like Cells: An Alternative Pathway of Tumour Angiogenesis. *Scand.J.Immunol.* 2007;65:329-335.
8. Zhou H, Wu S, Joo JY et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:381-384.
9. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006;24:781-792.
10. Wang HS, Hung SC, Peng ST et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004;22:1330-1337.
11. Wu KH, Zhou B, Lu SH et al. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J.Cell Biochem.* 2007;100:608-616.
12. Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 2008;134:833-848.
13. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008;26:591-599.
14. Hartmann I, Hollweck T, Haffner S et al. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. *J Immunol.Methods* 2010;363:80-89.

15. Hollweck T, Marschmann M, Hartmann I et al. Comparative analysis of adherence, viability, proliferation and morphology of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells seeded on different titanium-coated expanded polytetrafluoroethylene scaffolds. *Biomed.Mater.* 2010;5:065004.
16. Eissner G, Iacobelli M, Bluml S et al. Oligotide, a defibrotide derivative, protects human microvascular endothelial cells against fludarabine-induced activation, damage and allogenicity. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:915-920.