

# Tumorigenität, Überleben und Migration von Stammzellen

Prof. Dr. med. Sonja Schrepfer, TSI-Lab, Universitäres Herzzentrum Hamburg

Bei Herzinfarkt abgestorbenes Myokard kann bisher durch kein Therapieverfahren wiederhergestellt werden. Neue Hoffnung versprechen jedoch Ansätze auf der Basis der Stammzelltherapie. Die Transplantation von Stammzellen soll den ischämischen Myokardschaden verringern, eine Regeneration des Herzmuskelgewebes unterstützen und helfen, eine Verbesserung der Herzfunktion zu erzielen.

Ein grundsätzliches Problem der Stammzelltherapie des akuten Myokardinfarktes stellt die Verfügbarkeit (ausreichender Mengen) geeigneter Stammzellen zum Zeitpunkt der Akuttherapie dar. Ansätze, die eine Isolierung, Aufreinigung und Expansion spezifischer autologer adulter Stammzellpopulationen beinhalten, scheiden (daher) aus. Allogene embryonale oder adulte Stammzellen könnten zwar jederzeit bereitgestellt werden, werden jedoch nach Transplantation vom Empfänger-Immunsystem abgestoßen. Dieses Problem wurde in den letzten Jahren unterschätzt, da Stammzellen aufgrund ihrer reduzierten Expression Antigen-wirksamer MHC-Moleküle weitgehend als immunprivilegiert angesehen wurden<sup>1,2</sup>. Wir und andere Arbeitsgruppen konnten jedoch kürzlich zeigen, dass Stammzellen abgestoßen werden und dass eine starke Immunsuppression des Empfängers notwendig wäre, um diese Abstoßung zu verringern<sup>3-6</sup>. Wegen ihrer erheblichen Nebenwirkungen bei der Therapie des akuten Myokardinfarktes ist eine derartige Immunsuppression jedoch nicht zu vertreten.

Unser Labor erforscht transplantationsimmunologische Fragestellungen in der adulten, fetalen und embryonalen Stammzelltransplantation mit aktuellsten Methoden der Molekular- und Zellbiologie und Immunologie<sup>7</sup>. Das Ziel dieser Studien ist es, die immunologische Barriere zu überwinden und geeignete Zellen verfügbar zu machen. Dabei ist die *in-vivo*-Darstellung transplanteder Stammzellen im Wirtsorganismus von großer Bedeutung, um das Überleben der Stammzellen und ihre funktionelle Reorganisation sensitiv, akkurat und nicht-invasiv überwachen zu können. Die Biolumineszenz-Bildgebung eignet sich hervorragend für die Visualisierung der Zellwanderung und des Zellüberlebens in lebenden Organismen. Basierend auf dem Nachweis von Reportergenen ist die Mehrfachuntersuchung ein- und desselben Tieres und damit der dynamische Nachweis der Effektorzell-Migration möglich. Die Möglichkeiten dieser hochinnovativen Technik sind für viele medizinische Anwendungsgebiete von Bedeutung, so zum Beispiel in der

Onkologie, Inflammation, dem Metabolismus und der Toxikologie, Neurologie, Gentherapie und vielen anderen<sup>8-10</sup>.

## Biolumineszenz-Bildgebung in der Stammzelltransplantation

Humane embryonale Stammzellen (hESCs), die ausschließlich allogent transplantiert werden können, haben ein deutlich größeres regeneratives Potential als adulte Stammzellen. Ihr größter Vorteil ist die Pluripotenz, die ihnen zum Beispiel die Differenzierung in Herzmuskelzellen ermöglicht und somit enormes regeneratives Potential verleiht.

Aufgrund ihres frühen Entwicklungsstandes und der postulierten fehlenden Expression immunologisch relevanter Oberflächenmarker wurden Stammzellen als immunprivilegierte Zellen betrachtet<sup>1,2</sup>. Mittlerweile ist nachgewiesen, dass embryonale Stammzellen eine zwar geringe, aber dennoch hinreichend starke MHC-I-Expression aufweisen, um eine allogene Immunreaktion auszulösen und abgestoßen zu werden<sup>3-6</sup>.

Diese immunologische Barriere und die zur Abstoßung führenden Mechanismen müssen genauer definiert werden, um Ansätze zu finden, um die Abstoßung zu umgehen. Hierbei wird die *in-vivo*-Darstellung transplanteder Stammzellen im Wirtsorganismus einen erheblichen Einfluss auf die Akzeptanz zellbasierter Therapiestrategien haben.

Das TSI-Lab ist im Universitären Herzzentrum Hamburg (Herz- und Gefäßchirurgie; Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. med. H. Reichenspurner) angesiedelt. Die Zielsetzung unserer Arbeitsgruppe ist unter anderem die Charakterisierung der Immunbiologie embryonaler Stammzellen in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsgrad. *In vivo* sollen Stammzellmigration, Zellüberlebensrate und funktionelle Reorganisation sensitiv, akkurat und nicht invasiv überwacht werden, um die Grundlagen der Stammzellimmunbiologie mit Blick auf eine spätere klinische Translation zu verstehen.

Eine vielverwendete Möglichkeit, Stammzellen *in vivo* zu darzustellen, ist die magnetische Markierung der Zellen für die Magnetresonanztomographie (MRT)<sup>11</sup>. Mittels der MRT-Technologie wurden stabile Überlebensraten von transplanteden Stammzellen nachgewiesen. Mittlerweile ist jedoch belegt, dass die Stammzellen – und mit ihnen die Eisenpartikel – von Makrophagen aufgenommen wurden, so dass letztendlich die Makrophagenmigration visualisiert wurde<sup>1</sup>.

Die moderne Biolumineszenz-Bildgebung (Biolumineszenz-Imaging, BLI) basiert auf der hochempfindlichen Messung von *in vivo* emittiertem Licht<sup>12</sup>. Generiert wird dies durch transgene Expression lumineszierender Enzyme (Luziferase) oder passiv durch äußere Anregung fluoreszenter Proteine (vgl. Kasten). Mittels einer hochempfindlichen CCD-Kamera wird das für

## Laborwelt Hintergrund

### Lumineszenz und Luziferase-Reaktion

Luciferasen sind strukturell unterschiedliche Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferine mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen oder Dioxetanonen reagieren (Oxidation). Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz. Unterschieden werden unter anderen Firefly-Luciferasen (aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*, vgl. Foto), bei denen Luciferol, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht reagieren und Renilla-Luciferasen (aus der Seefedernart *Renilla reniformis*) die nur Luciferol und Sauerstoff (kein ATP) zur Reaktion benötigen<sup>12</sup>.



das menschliche Auge nicht wahrnehmbare Licht detektiert, gemessen und in Echtzeit auf ein Bild des Modells projiziert.

Reporter-Gen-Imaging ermöglicht die Dokumentation der Anzahl, Lokalisation, Proliferation und des Zelltodes transplantierter Stammzellen *in vivo*, indem der ATP-Gehalt der Zellen als Photonen pro Sekunde nicht-invasiv mittels eines Luciferase-Detektionssystems gemessen wird (Xenogen, CA, USA). Da das Entstehen des Lichtsignals ATP-abhängig ist, erlischt das Signal bei Zelltod, und es kann nicht auf andere Zellen übertragen werden – weder durch Fusion noch durch Aufnahme in Makrophagen. Diese neue, elegante Methode erlaubt außerdem wiederholte Messungen im gleichen Tier und ist signifikant sensitiver als herkömmliche Methoden wie die Histologie, lacZ-Färbungen, etc. (Abb. 1).

## Methode

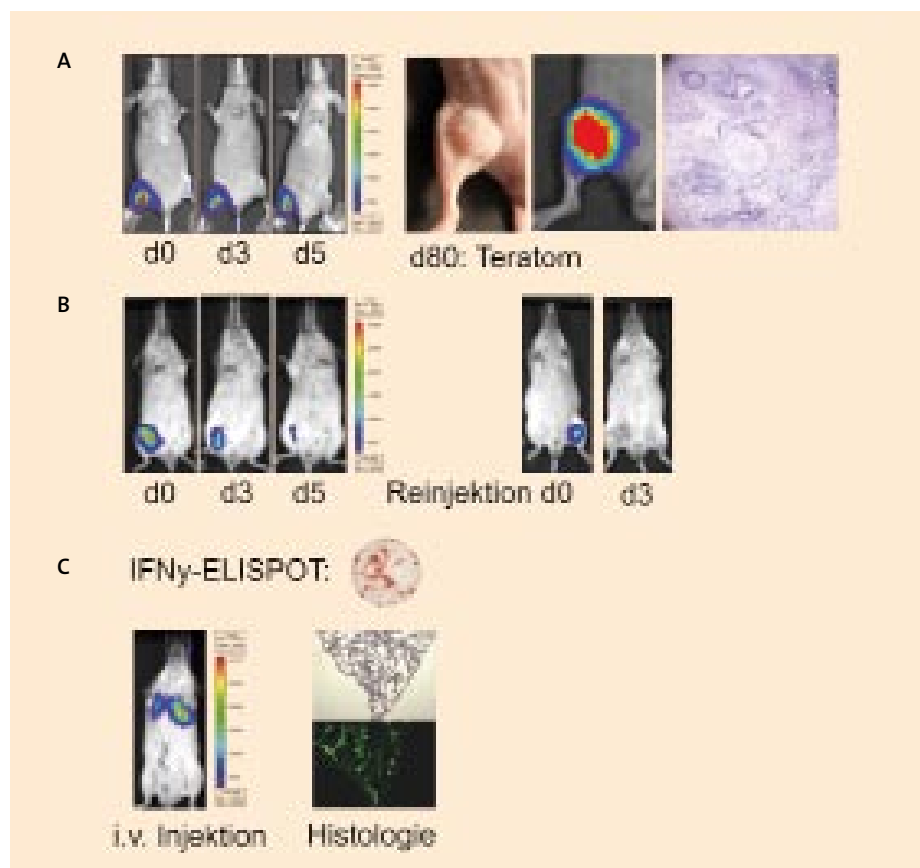
Die stabile Transduktion der undifferenzierten Stammzellen erfolgt retroviral mittels Lentiviren unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Die Zellen können nach Transduktion durch ihre Puromycin-Resistenz aufgereinigt und weiter expandiert werden. Wir haben eine gute Transduktionseffizienz bei hoher Zellviabilität beobachtet. Mittels des IVIS200 können bis zu fünf Mäuse simultan gemessen werden. Hierfür wird anästhesierten Mäusen 200 µl Luciferin i.p. appliziert, das entstehende Lichtsignal mittels IVIS200 quantifiziert und anschließend als Photonen pro Sekunde (total flux) und als  $\text{Log}_{10}(\text{photons}/\text{sec})$  dokumentiert.

## Nachweis der Tumorigenität embryonaler Stammzellen

Als Kontrollgruppe unserer Transplantatstudien dienen T-Zell-defiziente und somit immuninkompetente Balb/C nude-Mäuse (Abb. 1A). In diesem Wirtorganismus fand aufgrund der fehlenden T-Zellen keine zelluläre Abstoßung der undifferenzierten hESC statt. Aufgrund der fehlenden Immunreaktion bilden transplantierte undifferenzierte hESC Teratome<sup>9</sup>, die mittels BLI longitudinal *in vivo* überwacht werden können (Abb. 1A). Nach einigen Wochen wird der Tumor auch makroskopisch sichtbar und kann mittels Histologie und dem Nachweis von Zellen aller drei Keimblätter dokumentiert werden.

## Nachweis der Abstoßungskinetik

Mittels BLI haben wir die Abstoßungskinetik von hESC dokumentieren und die Rolle der angeborenen versus adaptiven Immunität *in vivo* untersuchen können. Erstmals kann nun longitudinal *in vivo* nachgewiesen werden, wie lange die Stammzellen überleben. Hierdurch ist es möglich, bei wiederholter Stammzelltransplantation zu dokumentieren,



**Abb. 1:** A: Biolumineszenz-Bildgebung zum Nachweis der Tumorigenität von Stammzellen: In immuninkompetente Mäuse transplantierte humane embryonale Stammzellen (hESC) am Transplantationstag (d0) und am dritten bzw. fünften postoperativen Tag (d3, d5). Nach 80 Tagen hat sich am Transplantationsort ein Tumor (Teratom) entwickelt, der makroskopisch und mittels BLI nachweisbar ist. Das Teratom wurde durch Nachweis von Zellen aller drei Keimblätter histologisch bestätigt. B: Biolumineszenz-Bildgebung zum Nachweis der Abstoßungskinetik: hESCs wurden in Balb/C-Mäuse transplantiert und mittels BLI am Transplantationstag (d0) und am dritten bzw. fünften postoperativen Tag (d3, d5) überwacht. An Tag 5 waren die hESCs abgestoßen. Eine Woche später wurden hESCs in die kontralaterale Seite der gleichen Mäuse transplantiert und mittels BLI eine akzelerierte und somit adaptive Immunantwort nachgewiesen, da die Zellen bereits am dritten Tag abgestoßen waren. Der Elispot für die  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion von  $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen der gleichen Tiere deutet auf eine zellulär vermittelte Abstoßung hin und bestätigt die mittels BLI nachgewiesene adaptive Immunantwort. C: Biolumineszenz-Bildgebung zum Nachweis der Stammzellmigration: Intravenös applizierte Stammzellen wurden bereits fünf Minuten nach Injektion mittels BLI in der Lunge nachgewiesen. Aufgrund ihrer Größe bleiben sie in den Lungenkapillaren hängen. Dies wurde mittels Histopathologie bestätigt. Hierfür wurden hESCs vor Injektion mit dem grünfluoreszierenden Farbstoff CSFE gefärbt (oben: H+E; unten: CSFE).

ob ein toleranter Status erreicht wird oder eine akzelerierte Abstoßung stattfindet (Abb. 1B). Hierfür wurden fluc-markierte hESCs intramuskulär in den rechten Oberschenkel von Balb/C-Mäusen transplantiert. Die Zellen wurden innerhalb von sieben Tagen abgestoßen. Bei Re-Transplantation der gleichen Zellen wurde eine akzelerierte Abstoßung innerhalb von drei Tagen dokumentiert, was für eine adaptive Immunantwort spricht (Abb. 1B: Reinjektion). Die BLI-Daten korrelierten mit unseren unidirektionalen ELISPOT-Daten für Interferon  $\gamma$ -produzierende  $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen. Hierfür wurden  $1 \times 10^7$  Mitomycin-inhibierte hESCs mit  $1 \times 10^6$  Milzzellen der transplantierten Mäuse

inkubiert und die Interferon  $\gamma$ -Sekretion ( $\text{T}_{\text{H}1}$ -Antwort) anhand der Spotanzahl mittels ELISPOT-Reader gemessen.

## Nachweis der Zellmigration

Die beste Applikationsart für Stammzellen zur Myokardregeneration nach einem Herzinfarkt ist bisher nicht definiert. In Frage kommen intravenöse, intrakoronare und intramyokardiale Applikationsformen. Mittels BLI haben wir dokumentiert, dass die intravenöse Applikation von Stammzellen zur Myokardregeneration ungeeignet ist (Abb. 1C). Nach intravenöser