



Forschung & Entwicklung am RTC

Genom-/Proteomforschung

Die Arbeitsgruppe um Prof. Steinhoff hat ein NOD/SCID Tiermodell (Mäuse ohne eigenes Immunsystem, geeignet zur Transplantation humaner Zellen) für akuten Myokardinfarkt etabliert. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Injektion verschiedener Stammzelltypen in den Herzmuskel zu einer höheren Kapillardichte führt. Aus anderen Versuchen ist bekannt, dass transplantierte CD133+ Zellen aus Knochenmark u.a. die Apoptose (programmierter Zelltod) von Kardiomyozyten reduzieren und zu einer höheren Kontraktilität des Gewebes führen können. Es fehlen bisher jedoch differentielle Analysen des Genoms und des Proteoms von Stammzellen, um die beschriebenen und weitere Effekte zu verstehen.

In Zusammenarbeit mit Prof. Takayuki Asahara (RIKEN Zentrum für Entwicklungsbiologie, Japan), einem der weltweit führenden Wissenschaftler im Bereich der endothelialen Vorläuferzellen für Gefäßneubildung (Angiogenese), wird derzeit als wichtiger Forschungsschwerpunkt des RTC die Proteomik der Stammzellfraktionen untersucht. Dazu zählt die Charakterisierung von endothelialen Vorläuferzellen durch 2D SDS-PAGE, MALDI-TOF Massenspektroskopie (*Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionization –Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry*, automatisierte Bestimmung der Masse von Proteinen und Peptiden und der Aminosäuresequenz) sowie MudPIT (*Multidimension protein identification technology*, Trennung und Identifikation komplexer Protein- und Peptidmischungen).

Tiermodelle

Bisher haben sich nach der Applikation von CD 133+SZ noch niemals toxischen Wirkungen oder Tumore am Herzen gezeigt. Zur weiteren Absicherung der Therapie sollen im Zentrum erweiterte systematische Forschungsarbeiten zu Tumorentwicklung und Toxizität von intrakardial applizierten CD133+ Stammzellen mit Zellmaterial von Patienten durchgeführt werden.

Mit neuen Methoden sollen Unbedenklichkeit und Wirksamkeit von humanen CD133+ Stammzellen belegt werden. Zu Gewebetoxizität (LD50) und Tumorpotential werden im NOD-SCID Mausmodell (intrakardiale Injektion) Serienuntersuchungen laufen. Dabei werden verschiedene Konzentrationen von Stammzellen ins normale und infarzierte Myokard injiziert. Die Gewebe- und Tumorentwicklung wird in Langzeituntersuchungen analysiert. Dieses Modell soll zukünftig als Grundlage für ein Standard-Testverfahren von Stammzellpräparaten in der präklinischen Testung eingesetzt werden. Die Prüfverfahren und Parameter werden im Forschungslabor des Zentrums entwickelt.

Die Qualität der Zellprodukte und die Standardisierung der Anwendung müssen vor einem breiträumigen Einsatz der Therapie sichergestellt werden. Zur weiteren Standardisierung des Zellproduktes für den therapeutischen Einsatz soll die Funktion der Knochenmarkstammzellen hinsichtlich ihrer Migrationskapazität untersucht werden. Dies erfolgt einerseits durch *in vitro* Assays in der Boyden-Chamber (Untersuchung der Chemotaxis mit SDF₁ α Gradient; interindividuelle



Variabilitäten), andererseits finden im Cremaster-Modell der Maus intravitalmikroskopische Untersuchungen statt (Regulation der intravaskulären Stammzelladhäsion durch SDF₁ α und TNF α). Interindividuelle Unterschiede können im Prüfverfahren getestet werden.

Stammzelldifferenzierung

Hier wird die Rolle von miRNAs (kleine RNA-Moleküle) bei der Differenzierung humaner Stammzellen in endotheliale Zellen untersucht. Solche fundamentalen Erkenntnisse sind zur weiteren Entwicklung von Stammzelltherapien für eine Vielzahl altersabhängiger kardiovaskulärer Erkrankungen notwendig.

Durch einen einzigartigen Mechanismus regulieren miRNA-Moleküle unter anderem die Genexpression während der Entwicklung von Herz- und Skelettmuskelgewebe. Diese regulatorischen Moleküle haben eine weitreichende Funktion bei der Kontrolle verschiedener Aspekte der Herzfunktion und -dysfunktion, einschließlich Myozytenwachstum, Integrität der Herzkammerwand, Kontraktilität, Genexpression und Erhalt des Herzrhythmus. Spezifische miRNAs sind in erkrankten Herzen fehlexprimiert. Aus Experimenten mit Funktionszuwachs und -verlust an Mäusen ist bekannt, dass viele Formen von Herzerkrankungen von diesen miRNAs abhängen.

Die Rolle der miRNAs spezifisch bei Gefäßerkrankungen ist jedoch bis heute vollkommen unbekannt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung ist eine Reihe von Forschungsansätzen geplant, wie z.B.

- Bestimmung, inwieweit miRNA die endotheliale Differenzierung von CD133+ Stammzellen vermitteln und auch eine Rolle in Entscheidungsprozessen der Proliferation versus Differenzierung von endothelialen Zellen innehaben
- Bestimmung, ob miRNAs die Differenzierung von CD133+ Zellen unterdrücken
- Erforschung der Mechanismen, durch die miRNAs mesodermales Gewebe, Endothelzell- oder Myozytendifferenzierung und -proliferation und deren potentielle Interaktionen auf spezifischen Signalwegen bestimmen
- Evaluation der miRNA-modifizierten CD133+ Zellen im Modell des akuten Myokardinfarkts und/oder der Ischämie der unteren Extremität.

Die Untersuchungen zielen auf die Optimierung der Technologie der microRNA Microarrays, um die globale Genexpression von microRNAs in verschiedenen Stammzellpopulationen zu analysieren.