



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Standardisierte Isolation und Expansion von Mesenchymalen
Stammzellen für die Klinische Anwendung**

Autor: Asli Serife Kocaömer
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. H. Klüter

Mesenchymale Stammzellen (MSC) stehen aufgrund ihres klinischen Potentials für Zelltherapien und Gewebeersatz derzeit im Fokus der adulten Stammzellforschung. Allerdings wird bisher bei den meisten Isolations- und Expansionsprotokollen für die Herstellung von MSC fötales Kälber Serum (FCS) verwendet, was mit potentiellen Risiken für Infektionen und immunologische Reaktionen verbunden ist. Das Ziel meiner Arbeit war ein standardisiertes Isolations- und Expansionsprotokoll für MSC zu entwickeln, welches kein FCS beinhaltet und somit eine Good Manufacturing Practice (GMP)-konforme Produktion und einen sicheren Einsatz von MSC in der Klinik ermöglicht. Als geeignete Alternativen zu FCS wurden gepooltes humanes AB-Serum (AB-HS) und Thrombin-aktiviertes Platelet-Rich-Plasma (tPRP) ausgewählt und deren Wirkung auf aus Fettgewebe gewonnene MSC untersucht. MSC wurden aus dem Fettgewebe von 10 Spendern gewonnen und unter drei verschiedenen Kultivierungsbedingungen expandiert: 1) 10% FCS, 2) 10% AB-HS und 3) 10% tPRP. Es wurden Colony-forming Units (CFU) gezählt und kumulative Populationsverdopplungen errechnet, während MSC maximal expandiert wurden. Die Differenzierungskapazität für die adipogene und osteogene Richtung wurde bei der ersten und siebten Passage untersucht. Oberflächenmarker wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie bei einer frühen und einer späten Passage charakterisiert. Bei allen Spendern und für alle Kultivierungsbedingungen konnte die Isolation erfolgreich durchgeführt werden. AB-HS und tPRP haben jedoch im Gegensatz zu FCS ein 20-23% stärkeres Wachstum induziert, wobei eine kumulative Verdopplungsrate von 40 bei Passage 8 erreicht wurde, verglichen zu 31 bei FCS ($p < 0,001$). Das Wachstum aller Zellen verlangsamte sich bei 40-50 Populationsverdopplungen; hierbei erreichten AB-HS und tPRP diesen Punkt früher (Passage 8-10) als FCS (Passage 13-14). Die Anzahl der Kolonien war vergleichbar (1 CFU pro 1000 Zellen), wohingegen AB-HS und tPRP Kolonien größer waren, als FCS Kolonien. MSC aller Kulturbedingungen ließen sich beständig bei Passage 1 und 7 sowohl in die adipogene, als auch in die osteogene Richtung differenzieren. Die Expression der Oberflächenmarker zeigte ein charakteristisches Muster für MSC und war vergleichbar für alle Kulturbedingungen. Die einzige Ausnahme bildete eine eindeutige CD14/CD45+ Population, deren Ausprägung von 5-30% reichte und abhängig von der Spendergruppe war. Eine semiquantitative Analyse des 72 Zytokinprofils von AB-HS und tPRP zeigte keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden. Obwohl MSC, welche mit alternativen Zusätzen kultiviert wurden, mit unveränderten MSC Qualitäten eine höhere Proliferationsrate aufwiesen, gab es dennoch Unterschiede bei Morphologie, Wachstumsmuster und Adhäsion. Dies weist auch auf Unterschiede bei der Protein- und Genexpression hin. Zusammenfassend habe ich gezeigt, dass gepooltes humanes AB-Serum und Thrombin-aktiviertes Platelet-Rich-Plasma bei der Isolation und Expansion von MSC aus Fettgewebe Alternativen zu FCS darstellen. Die Gefahr von Infektionen wird reduziert, da die humanen Quellen besser kontrollierbar sind als tierische Quellen. Außerdem gewährleisten die humanen Zusätze eine sogar höhere Proliferationsrate bei gleichzeitig unveränderter Differenzierungsfähigkeit und Oberflächenmarkerexpression in Langzeitkultur. Ein erster Schritt für einen GMP-konformen Herstellungsprozess von MSC ist somit getan. AB-HS ist hierbei der geeignetere Kandidat, da die Produktion weniger Schritte beinhaltet und der Umgang in der Zellkultur sich einfacher gestaltet. Der Gebrauch von Zellkulturzusätzen, die frei von tierischen Proteinen sind, wird die Einhaltung von GMP Richtlinien beträchtlich erleichtern und den Weg bahnen für den klinischen Einsatz von MSC.