

Patricia Janicki

Dr. sc. hum.

Proliferationskompetenz als Prädiktor der in vivo Knochenbildungsfähigkeit humaner mesenchymaler Stammzellen für das Knochen Tissue Engineering

Geboren am 21.08.1980 in Pyritz (Polen)

Diplom der Fachrichtung Biologie am 11.07.2006 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Orthopädie

Doktormutter: Prof. Dr. rer. biol. hum. W. Richter

Knochendefekte, die nicht in der Lage sind spontan zu heilen, können mit Hilfe von Knochenersatzstoffen und mesenchymalen Stammzellen (MSC) regeneriert werden. Die Entwicklung optimaler Heilungsmethoden wird jedoch durch eine große Spendervariabilität in der osteogenen Differenzierungskapazität humaner MSC erschwert. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte zunächst ein geeigneter Knochenersatzstoff gefunden werden, mit dem es möglich sein könnte, das Potenzial humaner MSC in einem ektopen Transplantationsmodell in immundefizienten Mäusen zu untersuchen. Eine phasenreine β -TCP-Keramik in Granulatform erwies sich dabei als osteokonduktiver und osteopermissiver als eine für das ektote Modell häufig verwendete HA/TCP-Keramik. Eine Analyse von drei verschiedenen β -TCP Partikelgrößen ergab, dass Granulate, die kleiner als 0.7 mm waren, humane MSC besser zur Knochenbildung anregen konnten als größere Partikel oder gar β -TCP Blöcke. Unabhängig vom Knochenersatzstoff bildeten humane MSC in ektopen Modellen neuen Knochen generell über eine desmale Ossifikation. Das bedeutet, dass sie ohne knorpelige Zwischenstufen direkt zu Knochenzellen differenzierten, während die dafür notwendige Durchblutung von der Maus zur Verfügung gestellt wurde. Durch eine chondrogene in vitro Vordifferenzierung der MSC in Gegenwart von β -TCP Granulaten konnte erstmals über den endochondralen Weg die Knochenbildung aus humanen MSC induziert werden. Der humane Ursprung des Knochens legte nahe, dass die MSC in vitro zu Chondrozyten und anschließend in vivo zu Osteoblasten weiterdifferenzierten, oder aber im Knorpelgewebe MSC verblieben waren, die den Knochen aufbauten. Damit muss die klassische Theorie des Absterbens aller Knorpelzellen und ein Knochenaufbau aus neu

einwandernden Vorläuferzellen während der endochondralen Knochenbildung überdacht werden.

Für die Untersuchung der Ursachen der Spendervariabilität humaner MSC wurden MSC-Populationen von Spendern unterschiedlichen Alters, Geschlechts und unterschiedlicher klinischer Vorgeschichte ausgewählt. Unter Gewährleistung identischer Bedingungen wurden parallel zur Analyse der in vivo Knochenbildungsfähigkeit der MSC quantitative Daten zu Proliferation, in vitro Differenzierungsfähigkeit und Genexpressionspiegel erhoben, um einen in vitro Parameter zu identifizieren, mit dessen Hilfe die Knochenbildungsfähigkeit der MSC vorhergesagt werden konnte. Während sich die osteogene in vitro Differenzierungsfähigkeit der MSC als nicht verlässlich erwies, korrelierte die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen stark mit ihrem Potenzial zur Knochenbildung. Eine Generationszeit von weniger als 43.23 Stunden pro Populationsverdopplung erwies sich dabei bei den hier gewählten Standardbedingungen als ein zuverlässiger Prädiktor der Knochenbildung, während MSC mit einer Verdopplungszeit von über 60 Stunden nie Knochen bilden konnten. Dazwischen befand sich ein Unschärfbereich der in etwa 20 % der untersuchten Fälle keine zuverlässige Vorhersage erlaubte. Mit einer Sensitivität von 81.8 % und einer Spezifität von 100 % ist dieser Prädiktionstest jedoch als hervorragend einzustufen, insbesondere da er sich auch über verschiedene Passagezahlen hinweg als zuverlässig erwies. Durch Manipulation der Wachstumsgeschwindigkeit wurde nachgewiesen, dass es möglich war – unabhängig vom Alter, Geschlecht und Krankheit des Spenders – die untersuchten MSC-Populationen zur Knochenbildung anzuregen bzw. sie daran zu hindern. Diese Promotionsarbeit beweist daher erstmals, dass der Verlust der Proliferationsfähigkeit humaner MSC die kausale Ursache für ihre fehlende Knochenbildungsfähigkeit darstellt.

Schlussendlich konnte der in der Literatur beschriebenen Variabilität humaner MSC in der in vivo Knochenbildung durch Manipulation des Wachstums begegnet werden, sodass durch die Bestimmung der Generationszeit der MSC vor der Transplantation neue Perspektiven für MSC-basierte Knochen Tissue Engineering Verfahren eröffnet wurden.