



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

**Analyse differentieller Gen- und Proteinexpression in
mesenchymalen Stromalzellen expandiert für die klinische
Anwendung**

Autor: Viet Anh-Thu Ha
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. K. Bieback

Mesenchymale Stromalzellen (MSCs) sind durch ihr multilineares Differenzierungspotential und ihre immunologischen Eigenschaften attraktive Kandidaten für verschiedene klinische Anwendungsmöglichkeiten und bereits Gegenstand zahlreicher klinischer Studien. Derzeitige Isolations- und Expansionsprotokolle von MSCs verwenden jedoch Fetales Kälberserum (FBS) als Kulturzusatz, um MSCs zu expandieren. Um das Risiko einer Krankheitsübertragung und immunologischer Reaktionen zu minimieren, sind aktuelle Studien bestrebt, FBS durch geeignete Derivate humaner Blutprodukte zu ersetzen.

In Vorarbeiten konnte an humanen MSCs aus Fettgewebe (ASCs), die in humanem AB-Serum (HS) oder thrombinaktiviertem Plättchen-reichem Plasma (tPRP) kultiviert wurden, gezeigt werden, dass eine effektive Isolation und Expansion unter Erhaltung von Differenzierungskapazität und Immunphänotyp möglich ist. Beobachtete Unterschiede in Morphologie, Expansions- und Adhäsionsverhalten lassen jedoch vermuten, dass das Expressionsmuster von Genen und Proteinen durch die humanen Kulturzusätze verändert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit waren daher weiterführende Untersuchungen auf zell- und molekularbiologischer Ebene durch differentielle Gen- und Proteinexpressionsanalysen.

Die Beobachtungen in Morphologie und Wachstumsmuster, die Ergebnisse der Immunphänotypisierung und der Nachweis der osteogenen und adipogenen Differenzierungsfähigkeit konnten reproduziert werden. Die verminderten Adhäsioneigenschaften von ASCs unter HS und tPRP im Vergleich zu FBS wurden im kinetischen Trypsinversuch semi-quantitativ nachgewiesen.

Mit Hilfe der Microarray-Technologie wurde eine differentielle Genexpressionsanalyse von ASCs durchgeführt, die unter den drei Kulturbedingungen FBS, HS und tPRP expandiert wurden. Insgesamt wurden aus einer Gesamtheit von 34.039 individuellen Genen 102 differentiell exprimierte Gene identifiziert, die signifikante Unterschiede aufwiesen. Davon zeigten alleine 90 Gene in FBS eine höhere Genexpression im Vergleich zu HS oder tPRP, die sich vorrangig den Gruppen „Zellentwicklung und -differenzierung“, „Extrazelluläre Matrix, Adhäsion und Migration“ und „Signaltransduktion, Zell-Zell-Interaktion“ zuordnen ließen. Lediglich 12 Gene waren bei den humanen Alternativen hochreguliert. Ein direkter Vergleich zwischen HS und tPRP zeigte keine wesentlichen Unterschiede im Genexpressionsprofil.

Während die Daten der Microarray-Analyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR anhand von 25 ausgewählten Kandidatengenen verifiziert wurden, konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie nicht in allen Fällen eine Korrelation auf Proteinebene nachgewiesen werden.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse die bisherigen Beobachtungen auf Zellkulturebene und weisen auf molekularer Ebene darauf hin, dass FBS zu geringen, aber relevanten Veränderungen im Genexpressionsprofil führt, die möglicherweise das Differenzierungs-, Expansions- und Adhäsionsverhalten in ASCs beeinträchtigen. Kulturzusätze humanen Ursprungs wie HS und tPRP könnten dagegen bessere Bedingungen für die *in-vitro*-Kultivierung herstellen, da sie kaum transkriptionelle Veränderungen bewirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen dazu, Veränderungen in ASCs durch Kulturzusätze auf molekularer Ebene besser zu verstehen, und bilden die Grundlage für weitere vergleichende Studien. Insgesamt trägt die Arbeit wesentlich dazu bei, optimale FBS-freie und GMP-konforme Kulturbedingungen zu etablieren und MSCs für die klinische Anwendung zu optimieren.