



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

**Proteomische Analyse von Plättchen Lysat und Releasat für die
Expansion von mesenchymalen Stromalen Zellen**

Autor: Sven Kinzebach
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. K. Bieback

Mesenchymal Stromale Zellen (MSC) gehören aufgrund ihrer Differenzierungs- progenerativen und immunregulatorischen Eigenschaften zu den interessantesten Kandidaten unter den adulten Stammzellen für die zellbasierte klinische Anwendung. Hierbei ermöglicht ihnen unter anderem ihre pro-Angiogenese Eigenschaft, Unterstützung der Gewebsregeneration und Beteiligung an der Wundheilung ein breitgefächertes Anwendungsgebiet. MSC können aus nahezu allen Geweben, wie z.B. Lipoaspirat, Knochenmark und Nabelschnurblut isoliert werden. Aufgrund der niedrigen Frequenz werden sie jedoch *ex vivo* expandiert. Hierbei müssen Richtlinien für einen GMP-konformen Herstellungsprozess gewährleistet sein, wobei optimale xeno-freie Zellkulturbedingungen geschaffen werden müssen. Hierzu konnte Thrombin-aktiviertes Plättchen Releasat in humanem Plasma (tPRP) und Plättchen Lysat in humanem Plasma (pHPL) als Alternative zu FBS beschrieben werden. Bestimmung der Expansionsraten ergaben hier unterschiedliche proliferative Antworten von MSC aus Knochenmark (eng. Bone Marrow, BM) und Lipoaspirat (LA) auf die humanen Alternativen. Wohingegen LA-MSC gleich stark in den Plättchen-Derivaten expandierten, proliferierten BM-MSC signifikant schneller in pHPL als in tPRP. Hierbei scheint es so, daß die Plättchen Derivate unterschiedliche aktivatorische bzw. inhibitorische Faktoren enthalten.

Charakterisierung von bioaktiven Faktoren in pHPL und tPRP und deren Auswirkung auf MSC

Der Fokus in der vorliegenden Arbeit lag darin, bioaktive Faktoren in pHPL und tPRP in Bezug auf die Proliferation zu identifizieren. Mittels 2D-DIGE und MALDI-TOF konnten vier höher abundante Proteine in tPRP und 12 in pHPL identifiziert werden. Dadurch wurde Fibrinogen und Apolipoprotein A1 (ApoA1) als pro-proliferativer Faktor für LA-MSC identifiziert, wohingegen ApoA1 die Expansion von BM-MSC signifikant hemmte. Weiter konnte eine Expansion in Serum-freiem Medium mit einer Kombination von Fibrinogen, ApoA1, ATP und bFGF bei initial FBS kultivierten BM- und LA-MSC verzeichnet werden. Neben dem indikativen Verbrauch von Wachstumsfaktoren und erhöhte Expression von Oberflächenrezeptoren zeigten Stimulationen mit bFGF ausschließlich einen pro-proliferativen Effekt bei LA-MSC in FBS kultiviert, wohingegen BM-MSC auch eine Expansionserhöhung in den humanen Alternativen erfuhren. Durch diese Studie konnten Proteine mit proliferativen Effekten auf MSC identifiziert werden, welche zuvor noch nicht mit MSC in Verbindung gebracht werden konnten. Durch diese Ergebnisse konnten neue Erkenntnisse in Bezug auf die Etablierung eines chemisch definierten serum-freien Mediums gewonnen werden.

Fibrinolyse

Zusätzlich wurde in dieser Studie die Beziehung der fibrinolytischen Aktivität in Bezug auf die Kulturbedingungen der MSC analysiert. In vorangegangenen Studien wurde der Zusammenhang der fibrinolytischen Aktivität von MSC mit ihrer unterstützenden Wirkung auf die Wundheilung diskutiert. Die vorliegenden Ergebnisse bewiesen einen stetigen proteolytischen Abbau eines Fibringerinnsels *in vitro*. Zusätzlich wurde gezeigt, daß MSC kultiviert in den Plättchen-Derivaten eine viel höhere fibrinolytische Aktivität aufweisen als in FBS, wobei ein generell schnellerer Abbau des Gerinnsels bei BM-MSC als LA-MSC beobachtet wurde. Diese Erkenntnisse führen zu einem besseren Verständnis der Unterstützung von MSC bei der Wundheilung und könnten für weiterführende *in vivo* Studien hilfreich sein.

Genexpressionsanalysen und Protein-Verifizierung

Eine in der Arbeitsgruppe vorangegangene Studie führte Genexpressionsanalysen bei LA-MS kultiviert in Human Serum (HS), tPRP und FBS durch. Dadurch konnten 90 Gene mit erhöhter Expression in den FBS Proben, zu 12 höher exprimierten Genen in den humanen Alternativen gefunden werden. Ein Großteil der identifizierten Gene in FBS gehört zu der Gruppe der Extrazellulär Matrix Proteine. Fibromodulin (FMOD) und Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) wurden beispielhaft weiter auf Protein Ebene untersucht. Verifizierungen dieser beiden Proteine ergaben korrelierende Ergebnisse zur Genexpression bei COMP. Dahingegen wurde FMOD gegensätzlich zur Genanalyse auf Proteinebene in den humanen Alternativen detektiert. Beide Proteine besitzen Einfluss auf das Differenzierungspotential von MSC, vor allem bei der Chondrogenese. Weiterführende Studien könnten den Einfluss der unterschiedlichen Expressionen dieser Proteine in Bezug auf ein besseres Verständnis der Differenzierungspotentiale und deren Mechanismen von MSC nutzen.