

Jennifer Fischer

Dr. sc. hum.

## **Einfluss artikulärer Chondrozyten auf die *in vitro*-Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen**

Promotionsfach: Orthopädie

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

Eine der größten Hürden für die *in vitro*-Generierung stammzellbasierter Knorpeltransplantate ist die Instabilität des artikulären Phänotyps der aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) gewonnenen Chondrozyten. Diese geht mit einer unerwünschten Hochregulation hypertropher Marker wie Kollagen Typ X und alkalische Phosphatase (ALP) einher und hat eine Kalzifizierung und Vaskularisierung ektopter Knorpelkonstrukte zur Folge. Im Gegensatz dazu sind artikuläre Chondrozyten in der Lage, unter den gleichen *in vitro*-Differenzierungsbedingungen stabilen Knorpel zu bilden, der nicht kalzifiziert. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob artikuläre Chondrozyten die Chondrogenese der Stammzellen zugunsten der Ausbildung eines stabileren artikulären Phänotyps unter gleichzeitiger Unterdrückung der hypertrophen Entwicklung beeinflussen können. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob Chondrozyten in Abwesenheit externer Wachstumsfaktoren eine Chondrogenese der MSC auslösen können und ob dadurch ein veränderter Differenzierungsweg eingeschlagen wird.

In einem indirekten Kokulturmodell wurde eine anabole Stimulation der MSC und eine um 250% erhöhte Kollagen Typ II-Ablagerung und eine relativ dazu deutlich verminderte Ablagerung von Kollagen Typ X im Pellet nachgewiesen werden. Desweiteren waren mRNA-Spiegel und Enzymaktivität der ALP signifikant verringert. Diese erstmalig für primäre MSC berichtete Entkopplung der Expression von Chondrogenese- und Hypertrophie-markern wird durch ein Zusammenspiel der anabolen und Hypertrophie-supprimierenden Wirkung des

konditionierten Mediums erreicht und belegt, dass Chondrozyten lösliche Faktoren sezernieren, die zu einer Stabilisierung eines artikulären Phänotyps chondrogen differenzierender MSC beitragen. Dabei konnte PTHrP als ein möglicher Vermittler dieser Effekte identifiziert werden, während ebenfalls im konditionierten Medium nachgewiesenes FGF-2 aufgrund einer zeitlich auf frühe Differenzierungsphasen beschränkten Sekretion vermutlich keinen wesentlichen Einfluss hatte. Zusätzlich konnte hier zum ersten Mal eine Herunterregulation von PTHrP zugunsten einer Hochregulation von IHH im Verlauf der *in vitro*-Chondrogenese der MSC beschrieben werden. Eine Beeinflussung dieser zeitlich reziproken Regulation von PTHrP und IHH durch die zeitlich verlängerte Präsenz von PTHrP durch das konditionierte Medium stellt einen möglichen molekularen Mechanismus für die günstigen Eigenschaften des konditionierten Mediums dar und legt eine verlängerte PTHrP-Expression der MSC als neuen Ansatzpunkt zur Entwicklung verbesserter Differenzierungsprotokolle nahe.

Die Fähigkeit artikulärer Chondrozyten zur Chondroinduktion von MSC wurde in einem direkten und in einem neuen, indirekten Kokulturmodell in Abwesenheit von externem TGF- $\beta$  untersucht. Während die direkte Kokultur in gemischten MSC-Chondrozytenpellets eher zum Verlust der MSC führte, deuteten erste Pilotversuche mit Chondrozyten-konditioniertem Medium eine gewisse Fähigkeit humaner artikulärer Chondrozyten zur Chondroinduktion von humanen, primären MSC unter gleichzeitiger Unterdrückung der Hypertrophie an.

Die Arbeit liefert somit mehrere neue Ansatzpunkte zur Verbesserung der *in vitro*-Chondrogenese von MSC und belegt einen günstigen Einfluss der von artikulären Chondrozyten sezernierten, löslichen Faktoren auf den entstehenden Phänotyp chondrogen differenzierender MSC.