

Anja Winter

Dr. sc. hum.

Stammzellcharakter und Chondrogenese von mesenchymalen Stromazellen aus Knochenmark und Fettgewebe

Geboren am 05.09.1974 in Saarbrücken

Reifeprüfung am 07.06.1994 in Saarbrücken

Studiengang der Fachrichtung Technische Biologie vom WS 1994/1995 bis WS 2000/2001

Vordiplom am 12.12.1996 an der Universität Stuttgart

Diplom am 07.11.2000 an der Universität Stuttgart

Promotionsfach: Immunologie (Arbeit an der Orthopädischen Universitätsklinik)

Doktormutter: Prof. Dr. W. Richter

Für die Regeneration von degeneriertem oder verletztem Gelenkknorpel stehen gegenwärtig nur unzureichende Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Der Bedarf an Knorpelzellen für die Zelltherapie und das Tissue Engineering von Knorpelgewebe könnte durch den Einsatz mesenchymaler Stammzellen gedeckt werden, zumal sie aufgrund ihres hohen Differenzierungspotentials für die Gewebsregeneration potentiell besser geeignet sind als autologe Chondrozyten, und ihre Gewinnung, Isolierung und Expansion weniger problematisch ist. Als Quelle für humane mesenchymale Vorläuferzellen bietet sich neben Knochenmark auch subkutanes Fettgewebe an, das leichter zugänglich ist und in größeren Mengen gewonnen werden kann, ohne starke Heilungsschmerzen zu verursachen.

Da Stromazellen aus Fettgewebe (SZFG) im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (SZKM) kaum charakterisiert sind, stand die vergleichende Untersuchung der Eignung dieser beiden Zelltypen für die Knorpelregeneration im Mittelpunkt dieser Arbeit. Für eine umfassende Untersuchung des molekularen Phänotyps der Zellen auf der Ebene der Genexpression wurde unter anderem ein maßgeschneiderter cDNA-Array eingesetzt, der durch eine gezielte Zusammenstellung Knorpel-assoziiierter Gene für die Analyse der Chondrogenese optimiert worden war.

Histologische und molekulare Untersuchungen nach adipogener, chondrogener und osteogener Differenzierung zeigten, daß SZKM und SZFG ein vergleichbares Multilineage-Potential aufweisen, da sie gleichermaßen für eine Differenzierung zu Knorpel-, Knochen- und Fettzellen geeignet waren.

Die adipogene Differenzierung wurde durch die Bildung von zahlreichen Lipidvesikeln und die Induktion Adipozyten-spezifischer Gene belegt. Nach chondrogener Induktion wurden mehrere, in Knorpel exprimierte Gene hochreguliert, wohingegen sich die Produktion einer mineralisierten Matrix bei osteogener Differenzierung nur geringfügig in dem Expressionsmuster der untersuchten Gene niederschlug, und bei SZKM in wenigen Zellen ein Phänotyp von Adipozyten induziert wurde.

In Monolayer-Kultur zeigten die Genexpressionsprofile chondrogen induzierter SZKM und SZFG wenig Unterschiede und ähnelten dem Expressionsmuster expandierter humaner Chondrozyten, die in Monolayer-Kultur dedifferenzieren. So waren die wichtigsten knorpelspezifischen Gene wie zum Beispiel Kollagen Typ II und Aggrekan in allen diesen Kulturen nicht nachweisbar. Nach Variation der Kulturbedingungen konnte beobachtet werden, daß eine Erhöhung der Zelldichte und Zellzahl sowohl bei SZKM als auch bei SZFG zur unmittelbaren, spontanen Bildung dreidimensionaler Zellverbände führte.

Durch Optimierung der Induktionsbedingungen, vor allem durch die Kultivierung in Form von Sphäroiden, konnte in SZKM zwei Wochen nach chondrogener Induktion ein Genexpressionsmuster erzeugt werden, das eine große Homologie zu dem nativen Knorpels aufwies. Das Expressionsprofil von SZFG blieb dagegen trotz der veränderten Kultivierungsform auch bei längerer Differenzierungsdauer auf dem unvollständigen Niveau der Monolayer-Kultur zurück, wodurch erstmals ein Unterschied im Differenzierungsverhalten von SZFG und SZKM gezeigt werden konnte. Während SZFG-Sphäroide eine faserartige Struktur aufwiesen und fast ausnahmslos negativ für Kollagen Typ II waren, wurden in SZKM-Sphäroiden zahlreiche, für gesundes Knorpelgewebe charakteristische Moleküle wie zum Beispiel Kollagen Typ II, Aggrekan und Link Protein induziert und eine knorpelige Struktur mit hohem Matrixanteil und geringer Zelldichte aufgebaut.

Aufgrund der limitierten chondrogenen Stimulierbarkeit erscheinen SZFG zum gegenwärtigen Zeitpunkt daher weniger gut für eine Zelltherapie von Knorpelgewebe geeignet. In einer SZFG-Kultur wurde allerdings eine chondrogene Differenzierung einschließlich der Expression von Kollagen Typ II beobachtet. Dies belegt, daß auch SZFG prinzipiell das Potential zu einer weitgehend vollständigen chondrogenen Differenzierung besitzen.

Die intensive Analyse der Genexpressionsveränderungen von Zellinteraktionsmolekülen, Matrixproteinen, Matrix-Metalloproteinasen und Transkriptionsregulatoren in SZKM-Sphäroiden während der in vitro Chondrogenese ermöglichte eine Charakterisierung von vier Differenzierungsphasen, die sich von dem natürlichen Verlauf der Knorpelbildung während der Embryonalentwicklung in vivo durch eine deregulierte Expression mehrerer, vor allem hypertropher Marker unterschieden.

Das Genexpressionsmuster von SZKM-Sphäroiden ähnelte aufgrund der Expression von hypertrophen Markern wie Kollagen Typ X, der Matrix-Metalloproteinase 13 und Osteopontin mehr dem Expressionsprofil von osteoarthrotischem als dem von gesundem

Gelenkknorpel. Der hypertrophe Phänotyp von SZKM könnte daher möglicherweise dem Zustand von Chondrozyten in osteoarthrotischem Knorpelgewebe nahekommen, das sich in einer Phase des Matrix-Remodellings befindet. SZKM-Sphäroide bieten sich daher als in vitro-Testsystem für die Wirkstoffsuche und die Entwicklung von medikamentösen Therapien für die Behandlung der Osteoarthrose an.

Fettgewebe sollte als vielversprechende Quelle für mesenchymale Stammzellen auch zukünftig Gegenstand intensiver Forschung sein, um das große Potential von SZFG für die Zelltherapie und das Tissue Engineering zu erschließen. Dabei ist eine Charakterisierung der Differenzierungsstadien während der Chondrogenese hilfreich für die Auswahl definierter Zellphänotypen, um in tierexperimentellen Studien die Eignung von SZKM und SZFG für die Behandlung von Knorpeldefekten zu überprüfen.