

Gitta Laitenberger

Dr. med.

Etablierung einer Zelllinie konditional immortaler Wachstumsfugen-Chondrozyten der Maus

Geboren am 31.08.1973 in Stuttgart

Reifeprüfung am 14.5.1993 in Stuttgart

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis SS 2001

Physikum am 21.3.1997 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 16.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. O. Mehls

Chondrozyten der Wachstumsfuge stehen in Primärkultur nur begrenzt für Experimente zur Verfügung. Ursächlich hierfür ist einerseits die geringe Zellzahl, die bei der Zellisolation aus der Wachstumsfuge der Ratte erhalten wird, andererseits die heterogene Zellzusammensetzung aufgrund einer Kontamination mit Fibro-, Osteo- und Angioblasten. Hinzu kommt die Neigung zu rascher Dedifferenzierung von Zellen in Primärkulturen. Diese Einschränkungen bestehen bei der Verwendung von Tumorzelllinien nicht, jedoch ist es bislang nicht gelungen, immortale Zellen mit einem physiologischen Phänotyp zu entwickeln. Ein neuartiges Kulturmodell, mit dem bereits Zelllinien von Podozyten, Tubulusepithelzellen, Osteoklasten und kardialen Endothelzellen etabliert wurden, wird durch die Möglichkeit der konditionalen Immortalisierung mit SV 40 Antigen ermöglicht. Hierbei stellen neben dem Erhalt des physiologischen Phänotyps v. a. Reinheit, Reproduzierbarkeit und uneingeschränkte Verfügbarkeit der Zellen wesentliche Vorteile experimenteller Untersuchungen dar. Es war Ziel der vorliegenden Arbeit dieses Kulturmodell erstmalig für Chondrozyten der Wachstumsfuge zu etablieren. Hierbei sollte die Verwendung tibialer Wachstumsfugen-Chondrozyten von SV 40 H-2K^b-tsA58 kompetenten Immortomäusen[®] und eine neue Form der klonalen Präexpansion und klonalen Selektion in einem dreidimensionalen Alginkultursystem die Grundlage zur Herstellung eines physiologischen Phänotyps und Ausbildung eines differenzierten Phänotyps durch steuerbare Immortalisierung mit SV 40 sein.

Es wurden Chondrozyten aus der tibialen Wachstumsfuge von SV40 H-2K^b-tsA58 kompetenten Immortomäusen[®] isoliert, suspendiert und in Alginatebeads, einer Matrix, die Chondrozytendifferenzierung fördert, kultiviert. Nach sechs Wochen hatten sich aus einzelnen Zellen dreidimensionale Kolonien von 2⁶ bis 2⁸ Zellen gebildet. Die ersten Klone wurden für Limiting Dilution ausgewählt, gefolgt von einem weiteren Zyklus der klonalen Expansion in Alginate. In einem zweiten Protokoll erfolgte die klonale Präexpansion und die Isolation der Zellklone, sowie die Subklonierung ausschließlich in Alginate.

Die gewählten Chondrozyten waren transgen für eine thermosensible Variante (ts 58A) des T-Antigens, dessen Expression in vitro durch γ -Interferon stimuliert werden kann. Kultivierte man die Chondrozyten unter permissiven Bedingungen (Inkubation bei 33°C, Zugabe von γ -Interferon) zeigten sie Eigenschaften ähnlich einer Tumorzelllinie (MCIC+) mit starker Zellproliferation. Kultivierte man sie hingegen bei 37°C ohne Zugabe von γ -Interferon (nichtpermissive Bedingungen), so wurde das immortalisierende Gen inaktiviert und die Chondrozyten differenzierten zu Zellen mit normalem chondrozytären Phänotyp (MCIC-).

Die Genexpression chondrozytentypischer Marker wurde durch Multiplex RT-PCR, die Proteinsynthese durch Western-Immunoblots, die Zellproliferation durch [³H]-Thymidineinbau und Ki-67 Genexpression und die Zellmorphologie, sowie die extrazelluläre Matrixbildung durch Licht- und Elektronenmikroskopie nachgewiesen. MCIC- Zellen in Alginat zeigten hierbei die typische Morphologie von differenzierten Chondrozyten mit aktiver Sekretion von Matrixvesikeln. Die Zellen waren von einer chondrozytentypischen dreidimensionalen proteoglykanreichen Matrix mit zahlreichen Kollagenfibrillen umgeben.

Im Vergleich zu Chondrozyten in Primärkultur zeigten MCIC+ Zellen eine geringere Kollagen 2 und Aggrecan Genexpression, eine vergleichbare Expression von Kollagen 1, Kollagen 10 und Osteopontin sowie eine verstärkte Expression von Osteocalcin. Unter nichtpermissiven Bedingungen (MCIC-) war in den ersten vier Tagen ein exponentieller Abfall der Proliferationsrate zu beobachten. Die Zellen differenzierten innerhalb von 4 bis 7 Tagen und exprimierten die typischen Differenzierungsmarker (Kollagen 2, 10 und Aggrecan) in vergleichbarer Menge wie Wachstumsfugen-Chondrozyten in Primärkulturen. Die Proteinsynthese von Kollagen 2 und 10 wurde im Western Blot bestätigt.

Die IGF-1 Genexpression war bei MCIC+ Zellen bedeutend stärker als bei MCIC- Zellen, die IGF-1-Rezeptor Genexpression deutlich geringer. Dies zeigt eine Rolle von IGF-1 und IGF-1-Rezeptor bei SV 40 induzierter Immortalität an. Die Genexpression der IGF-Bindungsproteine 1-6 war bei MCIC+ Zellen und MCIC- Zellen vergleichbar.

Zusammenfassend wurde eine Zelllinie konditional immortaler Wachstumsfugen-chondrozyten unter Verwendung einer Alginat-Suspensionkultur als neuartige Technik zur klonalen Prä-Expansion und -Selektion etabliert. Durch die Möglichkeit der selektiven Induktion des immortalisierenden Antigens zeigen die Zellen einerseits biologische Eigenschaften einer immortalen Zelllinie (MCIC) mit dem Vorteil der Gewebereinheit und uneingeschränkter Verfügbarkeit, andererseits kann leicht die Zelldifferenzierung für experimentelle Untersuchungen durch Änderung der Kulturbedingungen induziert werden. Dann haben sie die phänotypischen Eigenschaften primärer Wachstumsfugen-Chondrozyten und zeigen die Merkmale physiologischer Zellreifung. Mit diesem innovativen Modell eröffnet sich der Weg für relevante Knorpelforschung im Bereich des longitudinalen Knochen- und Körperwachstums.