

Thea Hennig

Dr. sc. hum.

**„Schlüsselfaktoren der chondrogenen Differenzierung: Eine vergleichende Untersuchung zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe“**

Geboren am 27.12.1978 in Hoyerswerda

Reifeprüfung am 03.07.1998

Studiengang der Fachrichtung Biotechnologie vom WS 1998/1999 bis WS 2002/2003

Vordiplom am 28.07.2000

Diplom am 14.04.2003

Promotionsfach: Immunologie (Arbeit an der Orthopädischen Universitätsklinik)

Doktormutter: Prof. Dr. W. Richter

Auf dem Gebiet der regenerativen Medizin von artikulärem Knorpel stehen derzeit nur wenige Therapiemöglichkeiten zur Verfügung, die sich hauptsächlich in der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) manifestieren. Um den Bedarf an Knorpelzellen zu decken, verspricht die Anwendung von MSC vor allem eine leichtere Isolierbarkeit und somit eine einfachere Therapie, ihr hohes Vermehrungspotential eine billigere Herstellung und ihre ausgeprägte Regenerationskapazität ein besseres Reparaturergebnis. Als Quelle für humane mesenchymale Vorläuferzellen bietet sich neben Knochenmark auch subkutanes Fettgewebe an, das leichter zugänglich ist, in größeren Mengen gewonnen werden kann und eine Entnahme kaum Heilungsschmerzen verursacht.

Während Sphäroide aus mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks (SZKM) unter den etablierten chondroinduktiven Kultivierungsparametern und unter dem Einfluss von TGF $\beta$ -3 in mehr als 90% der Fälle einen vollständigen Differenzierungszustand erreichten, bildeten nicht einmal 10% der Stammzellsphäroide aus dem Fettgewebe (SZFG) einen entsprechenden chondrogenen Differenzierungszustand aus. Für eine umfassende Charakterisierung beider Kulturen im molekularen Phänotyp wurde eine Knorpel-relevante Genexpressionsanalyse des Wachstumsfaktor- und Rezeptorrepertoires durchgeführt, um Hinweise für die Ursachen des limitierten chondrogenen Differenzierungspotentials von SZFG zu erhalten. Erst molekulare Untersuchungen des Wachstumsfaktorrepertoires gaben eindeutige Hinweise dafür, das limitierte chondrogene Differenzierungspotential von SZFG eliminieren zu können: Im

endogenen Repertoire der SZFG fehlten im Vergleich zu SZKM der TGF $\beta$  Rezeptor I sowie die Expression der BMPs 2, 4 und 6. Nach Optimierung der Standardkultivierungsbedingungen (TGF $\beta$ ) durch den zusätzlichen Einsatz, insbesondere von BMP6, das die Expression des TGF $\beta$  RI (ALK-5) induzierte, war ein System gefunden, die Chondrogenese von SZFG vergleichbar gut der von SZKM durchzuführen. Die erfolgreiche chondrogene Differenzierung war in MSC-Sphäroiden durch die Expression der beiden Marker IHH und BMP4 gekennzeichnet.

Beide Zellsysteme hatten aber den Nachteil, dass neben der erwünschten chondrogenen Differenzierung auch hypertrophe Marker wie Kollagen Typ X oder die alkalische Phosphatase induziert wurden. Dies ist deshalb von großem Nachteil, da die Expression dieser Marker in vivo mit der Kalzifizierung und Mikroosikelbildung einherging und somit letztendlich mit der Knochenbildung in Verbindung stehen.

Chondrozyten, die keine hypertrophen Marker exprimierten, zeigten im Vergleich zum Genexpressionsprofil expandierter und chondrogen induzierter MSC, dass die endogene Expression von Noggin negativ mit der von hypertrophen Markern korreliert war. Zudem zeigten Literaturdaten einen hemmenden Einfluss von PTHrP auf die Hypertrophie auf.

Die intensive Analyse von endogenen Stimulationskaskaden während der chondrogenen Differenzierung durch Untersuchung der Wirkung von PTHrP und Noggin hatten erste Erfolge eröffnet, in vitro der Ausbildung eines hypertrophen Phänotyps entgegenzuwirken. Während der additive Zusatz von PTHrP und Noggin mit Beginn der Induktion zur kompletten Inhibierung der Hypertrophie aber auch der Chondrogenese, durch Abschaltung von IHH und BMP4, in SZKM führte, ergab die sequentielle Gabe eine Verminderung des hypertrophen Phänotyps, ohne die Chondrogenese negativ zu beeinflussen. BMP4 und IHH sind daher nicht nur Marker einer erfolgreichen Chondrogenese, sondern haben als Schlüsselmoleküle auch eine funktionelle Bedeutung in der in vitro Chondrogenese von MSC.

Stammzellen als alternative Quelle zur Regeneration von Knorpeldefekten haben in den letzten Jahren einen bedeutenden Aufschwung erfahren. Diese Arbeit konnte hierfür einen entscheidenden Beitrag leisten, indem sie zeigt, wie mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe in Chondrozyten-ähnliche Zellen differenziert werden können. Zudem wurde ein funktionelles Verständnis zur Herstellung stabiler Chondrozyten gewonnen, die es ermöglichten der unerwünschten hypertrophen Differenzierung der Zellen in vitro erfolgreich entgegenzuwirken.