

Marcel Vetter

Dr. med

## **Expansion humaner mesenchymaler Stromazellen für den klinischen Einsatz und Analyse ihrer Funktionen**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Anthony D. Ho

Mesenchymale Stromazellen wurden in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckt und bereits 20 Jahre später im Rahmen erster klinischer Studien transplantiert. Heute gelten diese insbesondere auf dem Gebiet der regenerativen Medizin (z. B. bei Knorpelschaden) als vielversprechende therapeutische Option. Für den klinischen Einsatz dieser Zellen ist es erforderlich den gesamten Ablauf von der Isolation bis zur Transplantation gemäß den Anforderungen von GMP (= Good Manufacturing Practice) zu standardisieren und Risiken für die Patienten zu minimieren. Für Proliferation und weitere Eigenschaften der MSC spielt insbesondere das Expansionsmedium eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren wurden zwar zunehmend GMP-konforme Medien entwickelt, jedoch existiert nur eine begrenzte Menge an Daten bezüglich des Vergleiches dieser Medien.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei GMP-fähige Medien u.a. anhand der Proliferationsrate der MSC miteinander verglichen. Hierbei wurden das kommerzielle Medium StemPro<sup>®</sup> MSC SFM CTS<sup>™</sup> des Herstellers Invitrogen und nach einer Optimierungsphase das selbst hergestellte HPL-Medium verwandt. Um einen Vergleich mit den konventionellen, FCS-haltigen Medien zu ermöglichen, wurden die Experimente zudem mit dem nicht GMP-fähigen MSCGM<sup>™</sup> durchgeführt.

Die höchste Proliferationsrate für das HPL-Medium wurde mit dem Basalmedium LG-DMEM und 10% HPL sowie einer Aussaatdichte von 50 Zellen/cm<sup>2</sup> erreicht. Zellen aus HPL-Medium, StemPro<sup>®</sup> MSC SFM CTS<sup>™</sup> und MSCGM<sup>™</sup> waren adhärent zu Plastik, boten einen MSC-typischen Immunphänotyp und konnten adipogen, osteogen sowie chondrogen differenziert werden. Somit erfüllten Zellen aus allen untersuchten Medien die MSC-Kriterien der International Society for Cellular Therapy. Alle Medien führten zu einer suffizienten Proliferation. Sowohl die Kosten als auch die Proliferationsrate war bei Verwendung von StemPro<sup>®</sup> MSC SFM CTS<sup>™</sup> am höchsten. Somit war auch die Dauer der Expansion bis eine für die Transplantation ausreichende Zellzahl verfügbar wäre signifikant kürzer. Eine kurze in vitro Expansion ist für akute Indikationen primär relevant, könnte jedoch durch den Aufbau einer Kryobank an Bedeutung verlieren. Hinweise auf eine maligne Transformation fanden sich nicht.

Aufgrund der klinischen Anwendung von MSC zur Regeneration von Knorpel und Unterstützung der in vitro Expansion von HSC (Hämatopoetische Stammzellen) wurden entsprechende funktionelle Eigenschaften dieser Zellen untersucht. Die Bildung eines chondroiden Zellaggregates konnte sowohl MSC für StemPro<sup>®</sup> MSC SFM CTS<sup>™</sup> als auch HPL-Medium gezeigt werden, wobei letzteres zu größeren Aggregaten führte. MSC aus beiden Medien erhöhten die Proliferation von HSC während der Co-Kultur gleichermaßen. Die Stammzeleigenschaften von HSC wurden wahrscheinlich in Anwesenheit von MSC aus HPL-Medium besser erhalten als bei Verwendung von MSC aus StemPro<sup>®</sup> MSC SFM CTS<sup>™</sup>.

Das HPL-Medium ist gegenüber StemPro<sup>®</sup> MSC SFM CTS<sup>™</sup> aufgrund der kostengünstigeren und dennoch suffizienten Proliferation, der besseren funktionellen Eigenschaften, einer überlegenen (klinischen) Datenlage und der fehlenden Abhängigkeit vom Hersteller im Vorteil und bietet sich somit für den klinischen Einsatz an.

Aufgrund der Heterogenität innerhalb einer MSC-Population sind Marker von Vorteil, welche eine Anreicherung von MSC ermöglichen, die für eine bestimmte klinische Anwendung besonders gut geeignet sind. Daten aus der Maus deuten darauf hin, dass Nestin exprimierende MSC (MSC<sup>Nes+</sup>) einen supportiven Einfluss auf HSC ausüben. Diese Annahme beruht auf der starken Co-Lokalisation von MSC<sup>Nes+</sup> und HSC in der hämatologischen Nische sowie der gesteigerter Expression des für die HSC wichtigen Botenstoffes SDF-1 $\alpha$  durch MSC<sup>Nes+</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die humane MSC<sup>Nes+</sup> Subpopulation untersucht. Aufgrund der divergenten Angaben zur Größe dieser Subpopulation in der Literatur (0 bis 100%), stellte sich die Frage welche Faktoren die Expression beeinflussen. Es konnte nun erstmals gezeigt werden, dass die Anzahl von MSC<sup>Nes+</sup> von der Wahl des Zellkulturmediums und dem MSC-Spender abhängt. Die Dauer der in vitro Expansion hatte hierauf jedoch im Gegensatz zu Experimenten an murinen MSC (Daten aus der Literatur) keinen Einfluss. Der Anteil von MSC<sup>Nes+</sup> variierte je nach untersuchten Bedingungen im Wesentlichen zwischen 5 und 20%. SDF-1 $\alpha$  wurde in humanen MSC homogen exprimiert. Die Expression von SDF-1 $\alpha$  in humanen MSC korrelierte zumindest unter den gewählten Bedingungen nicht mit jener von Nestin. Ob diese Diskrepanz auf artspezifischen Unterschieden beruht oder methodisch bedingt ist (mRNA-Ebene in der Maus vs. Protein-Ebene im Menschen), ist unklar. Die Daten aus dem murinen Modell bezüglich MSC<sup>Nes+</sup> sind jedoch offenbar nicht direkt auf den Menschen übertragbar.