

Sebastian Frank

Dr. med.

Einfluss des Kulturmediums sowie der Separation nach CD146 während der Expansion auf die Proliferation und die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Sébastien Hagmann

Die regenerative Medizin birgt im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie die Chance, aktuell bestehende Therapielimitation zu überwinden, wobei das Tissue Engineering und die Zelltherapie bei der Weiterentwicklung der Behandlung von zerstörtem Knorpel- oder Knochengewebe hoffnungsträchtige Methoden darstellen. Das zentrale Element innerhalb dieser Forschungsfelder sind die dabei verwendeten Zellen, wobei hier mesenchymale Stromazellen zu den aussichtsreichsten Kandidaten zählen. Da aber keine einheitlichen Kulturmethoden für die Expansion der Zellen *ex vivo* vorliegen, herrschen teilweise massive Unterschiede zwischen den verschiedenen Laboren. Dies hat nicht nur heterogene Ergebnisse zur Folge, sondern macht auch ein Vergleichen der Resultate nahezu unmöglich. Bis auf wenige Arbeiten existiert in der gängigen Literatur ein Mangel an Studien, die sich mit dem Einfluss der Expansionsmedien auf die Proliferation und die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen befassen. Diese Arbeit beschäftigt sich systematisch mit dem Einfluss von verschiedenen Expansionsmedien auf das Wachstums- und das Differenzierungsverhalten dieser Zellen, um die dadurch entstehenden Unterschiede hervorzuheben und einen Beitrag zur Optimierung der Kulturbedingungen zu leisten. Zusätzlich wurden zwei Separationsmethoden für das CD146-Oberflächenantigen verglichen, da dieser Oberflächenmarker eine für die Weiterentwicklung des Tissue Engineerings vielversprechende Subpopulation charakterisiert.

In einem ersten Versuchsteil wurden zunächst vier gängige Expansionsmedien untersucht. Dabei zeigten sich zum Teil äußerst divergierende Proliferations- und Differenzierungsergebnisse der mesenchymalen Stromazellen in Abhängigkeit vom verwendeten Medium. Erstaunlicherweise waren dabei die Medien, die eine hohe Proliferation der Zellen zur Folge hatten, in Bezug auf die nachfolgende Differenzierung den

Medien unterlegen, die eine vergleichsweise geringe Zellproliferation bedingten. Diese Ergebnisse widersprechen dabei auch der gängigen Meinung, dass hochproliferative mesenchymale Stromazellen verbesserte Differenzierungseigenschaften aufweisen. Nachfolgend wurde für einen zweiten Versuchsteil das potenteste chondrogene Medium des ersten Versuchsteils als Basismedium verwendet. In diesem Abschnitt wurde der Fokus auf die Konzentration des fetalen Kälberserums im Expansionsmedium gelegt, wobei zwei verschiedene Konzentrationen zum Einsatz kamen. Die dabei gewonnenen Ergebnisse zur Zellproliferation decken sich nur zum Teil mit dem in der Literatur beschriebenen positiven Einfluss eines erhöhten Gehalts an fetalem Kälberserum auf die Proliferation der Zellen, da kein signifikanter Unterschied herausgearbeitet werden konnte. Dieses Phänomen könnte sich durch einen Ceiling-Effekt erklären lassen. Bei der Differenzierung ergab sich ein Trend zugunsten der Chondrogenese bei der Expansion mit einer höheren Konzentration, während die geringere Konzentration einen positiven Einfluss auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase der osteogen differenzierten Zellen aufwies. Da dabei erneut kein signifikanter Unterschied errechnet werden konnte, bleibt somit die Frage offen, ob hier wirklich ein Einfluss besteht oder ob auch für eine nachfolgende chondrogene Differenzierung ein Ceiling-Effekt hinsichtlich des Gehalts an fetalem Kälberserum besteht. Im Gegensatz dazu konnte bei unveränderter Darstellung der gängigen Positiv- bzw. Negativmarker ein deutlicher Unterschied der CD146-Expression detektiert werden, wobei ein erhöhter Gehalt an fetalem Kälberserum im Basismedium einen höheren Anteil an CD146-positiven Zellen bedingt. Abschließend wurde in einem letzten Versuchsteil das Medium mit dem höheren Gehalt an fetalem Kälberserum des zweiten Versuchsteils gegen ein embryonales Stammzellmedium getestet. Dabei konnte in diesem erstmalig durchgeführten, direkten Vergleich dieser beiden Expansionsmedien dargestellt werden, dass das embryonale Stammzellmedium zwar einige signifikante Vorteile in der Expansion von MSC beherbergt, aber die Differenzierung der Zellen in osteogener und chondrogener Richtung davon unbeeindruckt bleibt. Somit konnte, analog zum ersten Versuchsteil, gezeigt werden, dass eine verbesserte Proliferation nicht zwangsläufig auch eine verbesserte Differenzierung der Zellen nach sich zieht und somit kann die gängige Meinung diesbezüglich erneut in Frage gestellt werden. In Bezug auf die CD146-Expression erwies sich erneut das Medium des zweiten Versuchsteils als überlegen, welches so auch erstmals erwähnt wird und durch den Zusatz des Wachstumsfaktors im embryonalen Stammzellmedium erklärt werden kann. Die ebenfalls noch durchgeführte Separation der Zellen nach CD146 mit zwei verschiedenen Methoden wurde ebenfalls erstmalig durchgeführt und zeigte ein erstaunliches Ergebnis. So ist durch die Magnetseparation eine

höhere Reinheit zu erreichen, wohingegen die Sortierung über einen Durchflusszytometer zu einer Verbesserung der Proliferation sowie zu einer gesteigerten chondrogenen Differenzierung der Zellen führt. Diese verbesserte Proliferation sowie die gesteigerte chondrogene Differenzierung ist schwer zu erklären. Es könnte aber durchaus sein, dass die verbesserte Proliferation die Chondrogenese unterstützt, was im Einklang mit den bestehenden Forschungsergebnissen stehen würde, aber den Ergebnissen der Vorversuche widersprechen würde.

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen die Relevanz der Expansionsprotokolle bei Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen sowohl für deren Proliferation als auch für deren anschließende Differenzierung. Über sie kann der Erfolg von Forschungsarbeiten und regenerativen Therapieoptionen entscheidend beeinflusst werden und es sollten weitere Untersuchungen in dieser Richtung durchgeführt werden, um einheitliche und klar überlegene Protokolle zu etablieren.