

Ursula Kreuser

Dr. sc. hum.

## **Beitrag des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zur Knorpelneogenese von induzierten pluripotenten Stammzellen**

Fach/ Einrichtung: Orthopädie

Doktormutter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) sind vielversprechend für die Generierung von Knorpelersatzgewebe mittels Tissue Engineerings, weil sie zu Chondrozyten differenzieren können, nicht-invasiv verfügbar sind und nahezu unlimitiert vermehrt werden können. Jedoch ist die mesodermale iPSC-Differenzierung und die anschließende Spezifizierung zu Chondrozyten derzeit von einem großen Zellverlust gekennzeichnet, der die Gewebeausbeute stark limitiert. Ein besseres Verständnis der Schlüsselsignale, die die mesodermale iPSC-Differenzierung regulieren, ist notwendig um alle Zellen in die gewünschte Linie zu lenken und um die bisherige Notwendigkeit intermediärer Selektionsschritte zur Entfernung fehdifferenzierter Zellen zu überwinden. Das Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen ob die kurze initiale Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs mehr aggregierende mesodermale Vorläuferzellen aus iPSCs generieren würde, sodass eine Selektion obsolet wird und dadurch die bisher limitierte Gewebeausbeute nach der Chondrogenese deutlich verbessert wird. Dabei sollten vor allem auch die Mechanismen aufgeklärt werden, die der Determinierung von iPSCs durch eine kurze anfängliche WNT-Aktivierung zugrunde liegen, um ein tiefer gehendes Verständnis für diesen komplexen Differenzierungsprozess zu erlangen.

Mittels 24 h CHIR-Behandlung von iPSCs zu Beginn der mesodermalen Differenzierung wurde erfolgreich ein kurzes transientes WNT/ $\beta$ -Catenin-Signal erzielt, wie es im frühen Embryo zu Beginn der Mesodermentwicklung auftritt. Dieses kurze WNT/ $\beta$ -Catenin-Signal reichte aus, um die Zellproliferation während der gesamten mesodermalen Differenzierung zu erhöhen und somit weitaus mehr mesodermale Vorläuferzellen zu erhalten. Darüber hinaus förderte die kurze WNT-Aktivierung die Abschaltung Pluripotenz-erhaltender Gene und inhibierte die ektodermale Fehdifferenzierung zugunsten der erwünschten mesodermalen Differenzierung. Von besonderer Bedeutung war, dass ein kurzer initialer WNT-Puls ausreichte, um iPSCs in die mesodermale Entwicklungslinie zu determinieren und auch die Ausbildung von Charakteristika mesenchymaler Zellen zu fördern. So war die Expression von Kollagenen und anderen extrazellulären Matrix-assoziierten Genen verstärkt. WNT-induzierte Zellen zeigten eine stark erhöhte Fähigkeit zu aggregieren und im Folgenden eine mesenchymale

Kondensation zu durchlaufen. Das machte die Entfernung nicht-aggregierender Zellen zu Beginn der Chondrogenese obsolet und löste die bisherige Notwendigkeit spezifische mesodermale Subpopulationen selektieren zu müssen auf. Wie erhofft, zeigte die bessere Aggregationsfähigkeit nach dem WNT-Puls klare Vorteile für die anschließende Chondrogenese, denn nun nahmen nahezu alle Zellen an der Pelletbildung teil, was die Gewebeausbeute enorm erhöhte und auch die Ablagerung von Knorpelmatrix verstärkte.

In dieser Arbeit wurden somit extrazelluläre Matrix-Expression und Aggregation als fundamentale Zellfunktionen mesodermaler Vorläuferzellen identifiziert, die von der WNT-induzierten Festlegung auf das mesodermale Entwicklungsschicksal abhängig und für die anschließende Spezifizierung zu Chondrozyten von entscheidender Bedeutung waren. Damit zeigt diese Arbeit erstmals den essenziellen Beitrag einer kurzzeitigen WNT-Aktivierung zur mesodermalen Differenzierung von iPSCs auf. Diese mechanistischen Erkenntnisse könnten die mesodermale Vordifferenzierung von iPSCs nicht nur für die Generierung von Chondrozyten, sondern auch für die Spezifizierung zu Kardiomyozyten und skelettalen Muskelzellen wesentlich verbessern, und damit diese vielseitigen Zellen dem Einsatz in der Regenerativen Medizin, für Krankheitsmodelle und für pharmakologische Tests näherbringen. Künftige Arbeiten sollten nun die anschließende Spezifizierung zu matrixablagernden Chondroprogenitoren genauer beleuchten um damit die Knorpelneogenese aus iPSCs weiter zu verbessern