

Felicia Anna Maria Klampfleuthner
Dr. sc. hum.

Die Relevanz der AKT-Aktivierung für die *In-vitro*-Chondrogenese humaner mesenchymaler Stammzellen

Fach: Orthopädie
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. Solvig Diederichs

Eine vielversprechende Zellquelle für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe stellen mesenchymale Stromazellen (MSC) dar. Im Gegensatz zu artikulären Chondrozyten (AC) können MSC aus regenerierbaren Geweben wie Knochenmark isoliert werden ohne irreversible Schäden hervorzurufen. Bislang ist die Verwendung von MSC für die *In-vitro*-Knorpelneogenese allerdings durch ihre Differenzierung in einen hypertrophen Chondrozytenphänotyp limitiert, der aus der Wachstumsfuge bekannt ist und zu unerwünschter Knochenbildung führt. Um MSC zu einem AC-ähnlichen Phänotyp differenzieren zu können, müssen Signalwege identifiziert werden, die für diese enchondrale statt chondrale Fehldifferenzierung verantwortlich sein könnten. In diesem Kontext bisher nicht untersucht war der PI3K/AKT-Signalweg, der in der Wachstumsfuge als pro-hypertropher Effektor an der Chondrozytenhypertrophie und Knochenbildung beteiligt ist. Obwohl AKT während der MSC-Chondrogenese *in vitro* durch die Behandlung mit Insulin kontinuierlich aktiviert wird, war bisher überraschenderweise nicht geklärt, ob der PI3K/AKT-Signalweg die enchondrale Differenzierung von MSC *in vitro* fördert. Das Ziel dieser Studie war es daher, die Funktion des PI3K/AKT-Signalweges für die MSC-Chondrogenese *in vitro* aufzuklären. Anfängliche Untersuchungen, ob enchondral differenzierende Zellen sensitiver auf AKT-Stimulierung reagierten als chondral differenzierende Zellen, ergaben eine deutliche Abhängigkeit der AKT-Aktivierung vom Differenzierungsstadium. Trotz identischer und konstanter exogener Stimuli starteten MSC mit niedrigerer AKT-Aktivierung in die Knorpelneogenese als AC, steigerten die AKT-Aktivierung bis zum Erreichen des Stadiums proliferierender Chondroblasten, woraufhin die pAKT-Spiegel in beiden Zelltypen mit voranschreitender Chondrozytenreife abnahmen. Im Einklang mit der beobachteten Klimax der pAKT-Spiegel in einer Phase intensiver Proliferation trug endogenes FGFR-Signaling zur AKT-Aktivierung bei, das für seine proliferative Funktion bekannt ist. Im Gegensatz dazu inhibierte das in supraphysiologischen Konzentrationen verwendete TGF β 1 eine potentiell übermäßige AKT-Aktivierung. Eine Erhöhung der initial niedrigen pAKT-Spiegel steigerte zwar geringfügig die Proteoglykanablagerung, reduzierte aber vor allem die Zellzahl pro Pellet, so dass die niedrige initiale AKT-Aktivierung in MSC für das anfängliche Zellüberleben beim Übergang zur serumfreien chondrogenen 3D-Kultur notwendig war. Zur Beantwortung der Frage, welche Funktion die erhöhte AKT-Aktivierung in der späten MSC-Chondrogenese erfüllt, zeigten Inhibitionsversuche, dass die PI3K/AKT-Signalwegaktivität für die Aufrechterhaltung des Chondrozytenphänotyps und für die Knorpelmatrixablagerung essentiell war. Zum ersten Mal beschrieb diese Studie für die *In-vitro*-Knorpelneogenese die Notwendigkeit von PI3K/AKT-Aktivierung für adäquates TGF β /SMAD2-Signaling und die SOX9-Proteinakkumulation und untermauerte die pro-chondrogene Rolle von AKT, die im Kontrast zu *In-vivo*-Knockout-Studien steht, wo der Verlust einzelner Signalwegkomponenten offensichtlich besser kompensiert werden kann. Im Gegensatz zur Wachstumsfuge war für die MSC-Chondrogenese keine pro-hypertrophe AKT-Funktion evident, was wahrscheinlich auf die verwendete hohe Konzentration von anti-hypertroph wirkendem TGF β zurückzuführen war. Dass AKT-Aktivierung während der enchondralen MSC-Differenzierung die IBSP-Proteinspiegel reduzierte,

deutete auf eine multifaktorielle AKT-Funktion für die MSC-Chondrogenese hin, die neben einer pro-chondrogenen und in Abwesenheit von TGF β pro-hypertrophen auch eine selektiv anti-osteogene Wirkung beinhalten könnte.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass MSC im Verlauf der Chondrogenese unter konstanter Stimulation je nach Differenzierungsstadium ein variables Maß an AKT-Aktivierung benötigen. Da eine frühe AKT-Überstimulation den Zellverlust verstärkt und späte PI3K/AKT-Inhibition die Knorpelneogenese beeinträchtigt, müssen Modulationen des PI3K/AKT-Signalweges sorgfältig auf den chondrogenen Differenzierungsgrad abgestimmt werden. Die hier erstmals belegte Relevanz der steigenden AKT-Aktivierung für die MSC-Chondrogenese ist wegweisend für das Knorpel-Tissue-Engineering, da zukünftige Versuche, die Chondrozytenhypertrophie in vitro zu reduzieren, darauf abgestimmt sein müssen, nach initial niedriger AKT-Aktivierung einen differenzierungsabhängigen Anstieg der AKT-Signalwegaktivität zu ermöglichen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit erweitern unser noch lückenhaftes Verständnis von PI3K/AKT-abhängigen Differenzierungsprozessen, die entscheidend für eine erfolgreiche Knorpelneogenese mit MSC sind. Somit leistet diese Studie einen wichtigen Beitrag, um MSC in einen AC-ähnlichen Chondrozytenphänotyp differenzieren zu können, der uneingeschränkt für die klinische Knorpelregeneration einsetzbar ist.