



**Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg Medizinische Fakultät
Mannheim Dissertations-Kurzfassung**

Vergleichende Analyse von retinalen Perizyten und Fett-abgeleiteten mesenchymal stromalen Zellen vor dem Hintergrund hyperglykämischer Modifikationen der extrazellulären Matrix im Rahmen der diabetischen Retinopathie

Autor: Julian Eduard Gebauer
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. Med. Dr. rer. nat. K. Bieback

Im Verlauf der diabetischen Retinopathie (DR) gilt der Verlust von retinalen Perizyten als erstes Anzeichen dieser diabetischen Komplikation. Da mit aktuellen Therapieansätzen die Progression der DR derzeit nicht verhinderbar ist, besteht ein großer Bedarf an neuartigen Therapiemöglichkeiten. In diesem Rahmen werden derzeit in einer Vielzahl von Studien mesenchymal stromale Zellen (MSC) zur Therapie der DR erprobt. Auf Grund der morphologischen und funktionellen Gemeinsamkeit von MSC und Perizyten sowie ihrer Differenzierungskapazität und ihrem immunmodulatorischen Potential untersucht unsere Arbeitsgruppe die zelltherapeutische Verwendung von MSC zur Wiederherstellung der retinalen Integrität im Rahmen des Perizytenverlustes der DR. Mein Kollege Heiner Kremer konnte in vorangegangenen Versuchen zeigen, dass die Proliferation von humanen retinalen Perizyten durch Glukose-modifizierte extrazelluläre Endothelzellmatrix (ECM) deutlich eingeschränkt wird, während dies bei Fettgewebe-abgeleiteten mesenchymal stromalen Zellen (ASC) nicht der Fall war. Ziel meiner Arbeit war es, diese Beobachtung zu bestätigen sowie den molekularen Mechanismus aufzuklären.

Ich konnte mittels Live-Cell-Imaging bestätigen, dass Perizyten eine signifikant geringere Proliferation auf Glukose-modifizierte extrazelluläre Endothelzellmatrix zeigen, während ASC unbeeinflusst waren. Dabei konnte ich durch die Verwendung von humanen retinalen Endothelzellen eine starke Nähe des Zellkulturmodells zum Kontext der DR erreichen.

Auf der Suche nach der molekularen Ursache dieser Beobachtung, führten wir ein ausführliches Screening nach potentiellen Mechanismen der hyperglykämischen ECM Modifikation durch. Wir konnten jedoch weder Glykosaminoglykane, noch Matrix-Metallo-Proteinasen, noch Advanced Glycation Endproduct, noch Carbonylierung als ursächlich hierfür identifizieren. Ich stellte daher die Hypothese auf, dass es nicht durch zellphysiologische Reaktionen, sondern durch chemische oder physikalische Modifikationen der ECM zu einer Änderung ihrer Elastizität kommt. Um dies zu untersuchen erprobten wir die mikrorheologische Methode Multiple Particle Tracking zur Untersuchung der ECM in direkter Zellumgebung. Wir konnten erstmalig zeigen, dass die Methode für derartige Fragestellung geeignet ist und darüber hinaus erste Anzeichen für eine Glukose-vermittelte Änderung der ECM-Elastizität feststellen. Um die differentielle Sensitivität von ASC und Perizyten gegenüber Glukose modifizierter ECM auch aus der Blickrichtung dieser beiden Zelltypen zu betrachten, führten wir zudem eine detaillierte Analyse beider Zelltypen durch. Auf Basis einer MicroArray-Analyse überprüften wir durchflusszytometrisch ausgewählte Ergebnisse auf Oberflächenexpressionsebene.

Zusätzlich führte Agnese Fiori funktionelle Untersuchungen zur angiogenen Kapazität beider Zelltypen durch. Wir konnten alleine durch das angiogene Potential der ASC diese klar von Perizyten diskriminieren. Publierte Perizytenmarker sowie gängige MSC-Marker zeigten bei beiden Zelltypen ein ähnliches Expressionsprofil.

Auch in der Oberflächenexpression verschiedener Integrin-Untereinheiten zeigten sich, entgegen unserer Vermutung, dass diese die Unterschiede im Verhalten in unseren Proliferations-Experimenten erklären könnten, keine eindeutigen Unterschiede. Während die Verwendung von humanen Primärzellkulturen durch ihre große Relevanz für Fragestellung eine deutliche Stärke dieser Arbeit darstellt, bildet sie durch die geringe Verfügbarkeit an biologischen Replikaten der retinalen Primärzellen zugleich ihre größte Schwäche. Dennoch konnten wir eine gute Basis erarbeiten, um die knapp zur Verfügung stehenden retinalen Primärzellen in folgenden Projekten zielgerichtet und effizient weiter zu erforschen.

Im Rahmen des DIAMICOM-Verbundes verfolgen auch weitere Arbeitsgruppen die Hypothese, dass ASC die Rolle von Perizyten übernehmen können und sich somit für eine Zelltherapie der DR eignen. Betrachtet man zusätzlich die Daten meiner Kollegen Agnese Fiori, Heiner Kremer, Vincenzo Terlizzi und Hongpeng Huang, so müssen wir schlussfolgern, dass ASC sich hauptsächlich durch die Unterstützung der Angiogenese auszeichnen. Somit wäre ein zelltherapeutischer Ansatz der DR eher in einem sehr frühen Zeitpunkt anzusetzen, wohingegen eine ASC-Behandlung im Stadium der proliferativen DR kontraproduktiv erscheint. Wir erachtet es daher als notwendig, weitere detaillierte Analysen in geeigneten in-vitro und in-vivo Modellen durchzuführen, um eine sichere und erfolgreiche Therapie zu erzielen.