

# Zusammenfassung der Dissertation

Jakob Christian Hofmann

Dr. med.

## **Evaluierung des osteogenen Potentials von ABCB5<sup>+</sup> mesenchymalen Stammzellen in Rein- und Cokultur in vitro mittels verbesserten <sup>99m</sup>Tc-HDP-Labelings**

Fach: Orthopädie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Gerhard Schmidmaier

Das Vorhandensein von Zellen mit einem guten osteogenen Potential ist für die Behandlung von Knochendefekten essentiell und eine wesentliche Säule des Diamant-Konzepts. Entsprechend sind zelluläre Therapien eine effektive und komplikationsarme Therapieoption für die Behandlung von segmentalen Knochendefekten und Non-Unions. Die in diesem Rahmen am häufigsten verwendeten Zellen sind autologe humane mesenchymale Stammzellen (MSCs), deren hervorragendes osteogenes Potential in vitro und in vivo von zahlreichen Studien wiederholt bestätigt werden konnte. Da der autologe Einsatz von Knochenmark-MSCs durch ein begrenztes Reservoir des menschlichen Körpers sowie eine mitunter ausgeprägte Donor Site Morbidity bei Entnahme der Zellen limitiert ist, sind allogene MSCs eine vielversprechende alternative Zellquelle. ABCB5<sup>+</sup> MSCs sind dermale allogene MSCs, die ausgeprägte antiinflammatorische und proangiogene Eigenschaften aufweisen sowie zur Osteogenese befähigt sind. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die klinische Anwendung dieser Zellen in einem Knochendefekt einen positiven Effekt auf die Knochenheilung hat. ABCB5<sup>+</sup> MSCs sind in Deutschland kommerziell erhältlich.

Da es für die Untersuchung der osteoregenerativen Fähigkeiten verschiedener Zelllinien entscheidend ist, ihr osteogenes Potential präzise bestimmen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die bestehende Quantifizierungsmethode verbessert und um neue Aspekte erweitert. Für die Bestimmung des osteogenen Potentials ist insbesondere die Menge an gebildetem Hydroxylapatit maßgeblich. Um diese präzise und schnell quantifizieren zu können, hat sich das Radioaktivlabeling mit <sup>99m</sup>Technetium-Hydroxydiphosphonat (<sup>99m</sup>Tc-HDP) etabliert. Beim <sup>99m</sup>Tc-HDP-Labeling handelt es sich um ein hochsensitives, einfach zu handhabendes und vor allem zerstörungsfreies Messverfahren, mit dem die Menge an synthetisiertem Hydroxylapatit in vitro ermittelt werden kann, indem der Tracer daran bindet und anschließend das radioaktive Uptake bestimmt wird. Obwohl dieses Verfahren mittlerweile fest etabliert ist, lagen bisher keine Daten zur Inkubations- und Uptakekinetik vor. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für ein In-vitro-Labeling von osteogenen Knochenmark-MSC-Kulturen mit <sup>99m</sup>Tc-HDP eine Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur völlig ausreichend ist um eine Bindung des Tracers zu gewährleisten. Durch diese Verkürzung der

Inkubationszeit entstand kein Nachteil hinsichtlich der Sensitivität der Methode verglichen mit der üblichen Inkubationszeit von 2 h. Durch diese neuen Erkenntnisse konnte die Methode aufgrund der deutlichen Zeitersparnis wesentlich verbessert werden.

In einer nächsten Stufe der Methoden-Weiterentwicklung wurde untersucht, ob das Radioaktivlabeling mit  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP auch dazu geeignet ist, in „real Time“, also während einer laufenden osteogenen Zellkultur, den Grad der Osteogenese zu bestimmen. Das Real-Time-Labeling setzt jedoch voraus, dass die wiederholte Exposition der Zellkulturen gegenüber  $\gamma$ -Strahlung zu keinen negativen Effekten auf das osteogene Potential der MSCs führt. Diese Arbeit konnte  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP erfolgreich als Tracer für die neue Methode des Real-Time-Labelings etablieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass wiederholt gegenüber  $^{99m}\text{Tc}$  exponierte Zellkulturen kein schlechteres osteogenes Potential aufweisen als diejenigen, die nur einmalig gelabelt wurden. Vielmehr wiesen die wiederholt gelabelten Kulturen nach drei Wochen Zellkultur sogar ein signifikant besseres osteogenes Potential im direkten Vergleich mit der nur einfach gelabelten Zellkultur auf. Damit ist es zukünftig möglich, den Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf das osteogene Potential mesenchymaler Stammzellen über die Zeit einer laufenden Zellkultur hinweg zu untersuchen, ohne, dass dafür mehrere Ansätze benötigt werden. In Kombination mit dreidimensionalen Detektionsverfahren für die von  $^{99m}\text{Tc}$  emittierten  $\gamma$ -Strahlung, wie beispielsweise Gammakameras, ist das  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP-Labeling somit ein Messverfahren des osteogenen Potentials mit unvergleichlicher zeitlicher und räumlicher Auflösung. Zukünftig können Experimente sehr viel effizienter durchgeführt werden bei deutlicher Einsparung von Ressourcen im Labor.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde unter Verwendung des verbesserten  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP-Labelings das osteogene Potential von ABCB5<sup>+</sup> MSCs untersucht sowie die synergistischen Effekte, die durch die Cokultivierung von Knochenmark-MSCs und ABCB5<sup>+</sup> MSCs entstehen. Es konnte gezeigt werden, dass in einer Knochenmark-MSC Zellkultur 90% der Knochenmark-MSCs durch ABCB5<sup>+</sup> MSCs ersetzt werden konnten, ohne dass sich das osteogene Potential von dem einer Reinkultur aus Knochenmark-MSCs unterscheidet. Das vorbeschriebene gute osteogene Potential von Reinkulturen aus ABCB5<sup>+</sup> MSCs in vitro konnte in dieser Arbeit hingegen nicht reproduziert werden. Da allogene Zelllinien quasi unbegrenzt erzeugt werden können, geben die Ergebnisse erste Hinweise auf zukünftige Einsatzmöglichkeiten dieser Zellen, auch wenn die Ergebnisse erst am Anfang einer Translation der In-vitro-Resultate in den klinischen Alltag stehen. Durch die Ergebnisse konnten wesentliche Erkenntnisse im Bereich der Grundlagenforschung mit ABCB5<sup>+</sup> MSCs gewonnen werden, welche unabdingbar für die Weiterentwicklung zellulärer Therapien bis hin zu vollständigen Behandlungsansätzen sind.

Zusammenfassend wurde innerhalb dieser Arbeit zunächst die Methode des  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP-Labelings zur Bestimmung des osteogenen Potentials von MSCs deutlich verbessert, indem die Inkubationszeit drastisch reduziert und die neue Methode des Real-Time-Labelings etabliert werden konnte. Unter Verwendung dieser Methoden wurde dann die allogene Stammzelllinie der ABCB5<sup>+</sup> MSCs hinsichtlich ihrer osteogenen Kapazitäten evaluiert, wobei die wesentliche neue Erkenntnis gewonnen wurde, dass diese Zellen bis zu 90% der Knochenmark-MSCs in einer Zellkultur ersetzen können bei gleichem osteogenem Potential der Gesamtkultur. Dies ist ein erster Hinweis auf das mögliche klinische Potential dieser Zellen als zukünftige allogene Zellquelle bei der Behandlung von Knochendefekten und Non-Unions.