

Andrea Dickhut

Dr. sc. hum.

Stammzellbasiertes Tissue Engineering von Knorpelgewebe – Untersuchungen zum Einfluss der Mikroumgebung auf die chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Geboren am 10.05.1979 in Verl

Diplom der Fachrichtung Biologie am 05.12.2003 an der Universität Bielefeld

Promotionsfach: Immunologie (Arbeit an der Orthopädischen Universitätsklinik)

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

Der Differenzierungszustand von mesenchymalen Stammzellen (MSC) wird durch die Beschaffenheit ihrer Mikroumgebung reguliert, die deshalb für den Erfolg einer angestrebten stammzellbasierten Knorpelregeneration von entscheidender Bedeutung sein könnte. In dieser Arbeit wurde untersucht, in wieweit die chondrogene Differenzierung von MSC aus Knochenmark und Fettgewebe durch ihre Mikroumgebung beeinflusst wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Trägermaterialien auf die Chondrogenese von MSC untersucht, da der Einsatz von Trägermaterialien bei der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) weit verbreitet ist. Bislang war aber unklar, ob derartige Materialien auch die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC) unterstützen. Die Chondrogenese wurde durch alle vier verwendeten gelartigen Trägermaterialien (ein Kollagen Typ I-Gel, ein Fibringel, MatrigelTM und PuraMatrixTM) günstig beeinflusst. Die Matrigel-Konstrukte wiesen eine frühe Hochregulation von COL2A1 auf, Fibrin und Matrigel förderten die Kollagensynthese und PuraMatrix verbesserte die Ablagerung von Proteoglycanen, während die Differenzierung unter suboptimalen Bedingungen zum Teil durch alle Materialien, immer jedoch durch PuraMatrix verbessert wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse, die zeigen, dass die trägerfreie Pelletkultur als bisherige Standardkulturform nicht die optimale Kulturform darstellt, sollte der Einsatz von Trägermaterialien generell in Erwägung gezogen werden. Neben der *in vitro* Differenzierung ist auch die *in vivo* Entwicklung der chondrogen differenzierten MSC für die angestrebte Regeneration von Gelenkknorpelschäden von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit wurde erstmals demonstriert, dass es auch bei MSC aus Fettgewebe ähnlich wie bei MSC aus Knochenmark nach ektopter Transplantation in die SCID-Maus nicht wie bei Chondrozyten zu einer Bildung von stabilem Knorpelgewebe kommt, sondern von transientem, kalzifiziertem Knorpelgewebe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der beobachtete, der endochondralen Ossifikation ähnelnde Entwicklungsprozess nicht durch die Herkunft von MSC aus Knochenmark und damit einer knöchernen Umgebung begründet ist, sondern durch

die angewandten Differenzierungsprotokolle induziert wird. Die unerwünschte *in vivo* Kalzifizierung der MSC aus Fettgewebe wurde durch Einbringen der Zellen in Matrigel unterdrückt, während die anderen Materialien die Kalzifizierung nicht erkennbar beeinflussten. Dies zeigt, dass der Differenzierungszustand der MSC nach ektopter Transplantation durch die Mikroumgebung der MSC nachhaltig beeinflusst wird und die Möglichkeit besteht, die erzielte Differenzierung durch Manipulation der Mikroumgebung gezielt zu stabilisieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Chondrozyten und Synovialmembranzellen auf die Chondrogenese von MSC aus dem Knochenmark analysiert. Durch den Einfluss von Chondrozyten wurde die Expression und Aktivität des hypertrophen Markers Alkalische Phosphatase (ALP) *in vitro* erfolgreich verringert und die unerwünschte *in vivo* Kalzifizierung reduziert oder sogar vollständig unterdrückt, während Synovialmembranzellen die ALP-Aktivität und die *in vivo* Kalzifizierung nur geringfügig verringerten. Eine Kultur mit durch Chondrozyten konditioniertem Medium bewirkte zusätzlich eine Erhöhung der COL2A1-Expression, d. h. eine Verbesserung der Differenzierung der MSC. Eine Identifikation der verantwortlichen Faktoren könnte in Zukunft entscheidend dazu beitragen, die gängigen Differenzierungsprotokolle so zu optimieren, dass die Chondrogenese effizienter induziert werden kann und eine Erzeugung von stabilem anstelle von transientem Knorpel aus MSC möglich ist.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde versucht, eine Mikroumgebung zu schaffen, die eine *in vivo* Differenzierung von MSC ermöglicht. MSC wurden zusammen mit den Chondrogenese-induzierenden Faktoren TGF- β 3 und BMP-6 in Gelmaterialien eingebracht und subkutan in SCID-Mäuse transplantiert. Eine *in vivo* Differenzierung ohne vorausgehende *in vitro* Induktion war bei MSC aus Fettgewebe in Ansätzen erkennbar, jedoch war die Ablagerung der Proteoglycan- und Kollagen Typ II-haltigen Extrazellulärmatrix aufgrund einer starken Degradation der Transplantate begrenzt. Weitere Untersuchungen zur *in vivo* Differenzierung von MSC in orthotopen Defektmodellen erscheinen unumgänglich, um in Zukunft einen optimierten und risikofreien Einsatz von mesenchymalen Stammzellen in Knorpelreparaturverfahren zu ermöglichen.