

Karoliina Pelttari

Dr. sc. hum

Vorhersage der ektopen Knorpelbildungsfähigkeit expandierter artikulärer Chondrozyten und Charakterisierung der Differenzierungsstabilität mesenchymaler Stammzellen *in vivo*

Geboren am 17.03.1978 in Vammala (Finnland)

Diplom der Fachrichtung Molekularbiologie am 19.9.2003 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Orthopädie

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

Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) wird klinisch seit über einer Dekade an vielen Zentren in Europa und USA zur Behandlung fokaler Knorpeldefekte im Kniegelenk eingesetzt. Obwohl bekannt ist, dass Chondrozyten bei Vermehrung in Zellkultur rasch ihre Fähigkeit zur Knorpelbildung verlieren können, wird der Differenzierungszustand dieser Zellen vor Transplantation in den Defekt bisher nicht kontrolliert. Anzunehmen ist, dass Chondrozyten, die noch in der Lage sind, ektop Knorpel zu bilden, hochwertigeren Reparaturknorpel regenerieren als dedifferenzierte Zellen, die möglicherweise nur noch minderwertigen Faserknorpel ausbilden. Das erste Ziel dieser Promotionsarbeit war es, Qualitätsparameter zur Bestimmung des Differenzierungszustands von Chondrozyten zu etablieren, die in der Lage sind, die Fähigkeit expandierter Zellen zur ektopen Knorpelmatrixsynthese *in vivo* vorherzusagen und im Vorfeld der Operation Aufschluss über ihre Tauglichkeit geben können. Da die Gewinnung und Expansion autologer Chondrozyten jedoch noch immer mit Problemen verbunden ist, sollte darüber hinaus die generelle Eignung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) als alternative Zellquelle für Chondrozyten überprüft und ihre Fähigkeit zur Bildung hyalinen Knorpels nach ektopter Transplantation analysiert werden.

Mittels cDNA-Array Analyse, Multiplexed Immunoassays und kommerzieller ELISAs wurden MMP3 und SerpinA1 als potentielle Marker identifiziert, die auf mRNA- und Proteinebene mit der ektopen Knorpelbildungsfähigkeit korrelierten. Frisch isolierte sowie expandierte Chondrozyten, die - in Bezug auf die ursprüngliche Konzentration direkt nach Isolation aus der Knorpelmatrix - MMP3 in einer relativen Menge von mehr als 18% sowie mindestens 75% SerpinA1 in den Überstand sezernieren, bildeten subkutan stabilen Knorpel. Relative MMP3- und SerpinA1-Proteinkonzentrationen von weniger als 10%, bzw. 45%

hingegen korrelierten mit der Bildung eines fibrösen Regenerats. MMP3 und SerpinA1 eignen sich daher als Indikatoren des Differenzierungszustandes von expandierten Chondrozyten und können zur Bestimmung der Zellqualität vor ihrem Einsatz in der ACT herangezogen werden.

Nach ausreichend langer chondrogener Vor-Differenzierung in Pelletkultur *in vitro*, ließen sich aus MSC Chondrozyten herstellen, die auch nach ektopter Transplantation *in vivo* ihre Proteoglykan- und Kollagen Typ II-reiche knorpelige Matrix behielten. Ihre unerwünschte, aber *in vitro* unter Standardbedingungen stets induzierte, hypertrophe Entwicklung resultierte *in vivo* jedoch in einer Mineralisierung, Vaskularisierung und Bildung von Mikroossikeln, die für expandierte Chondrozyten aus Gelenkknorpel nie beobachtet wurde. Die chondrogene Differenzierung von MSC führte damit zur Induktion eines Prozesses ähnlich dem der endochondralen Ossifikation in der Wachstumsfuge, während artikuläre Chondrozyten unter gleichen Bedingungen die für artikulären Knorpel typische stabile Unterdrückung hypertropher Differenzierungszustände beibehielten. Weitere Untersuchungen zum Einsatz nicht differenzierter MSC, zur Optimierung von *in vitro* Differenzierungsbedingungen zur Unterdrückung der Hypertrophie sowie zum Einsatz von MSC in orthotopen Defektmodellen sind erforderlich, um in Zukunft den risikofreien Einsatz mesenchymaler Stammzellen in der Knorpelregeneration zu ermöglichen.