

# Robuste Expansion von humanen mesenchymalen Stammzellen mit der synthetischen CCCadvanced® FN1 motifs Wachstums Oberfläche

AURÉLIE TACHENY, WIÂME BEN EL MOSTAPHA, FRANÇOISE DE LONGUEVILLE, EPPENDORF APPLICATION TECHNOLOGIES S.A., NAMUR, BELGIEN  
NADINE MELLIES, EPPENDORF AG, HAMBURG

## Einleitung

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) haben in den letzten zehn Jahren zunehmendes Interesse geweckt. Es handelt sich hierbei um multipotente Zellen in einer heterogenen Population, die aus unterschiedlichen Geweben isoliert werden können [1]. Ihre spezifischen Eigenschaften, wie z.B. ihr mesenchymales Differenzierungspotenzial sowie die Immunmodulation und Sekretion von entzündungshemmenden Molekülen, machen sie zu einer vielversprechenden Stammzellpopulation auf verschiedenen Gebieten der Grundlagen- bzw. angewandten Forschung [2]. Da sie in ihren Ursprungsgeweben in relativ geringer Zellzahl vorliegen, erfordert es einen robusten *in vitro* Expansionsprozess, um eine ausreichende Anzahl an qualitativ hochwertigen hMSCs zu erhalten.

Für gewöhnlich werden hMSCs *in vitro* in serumhaltigem Medium auf einer TC-behandelten (TCT) Oberfläche expandiert. Allerdings ist der Gebrauch von aus Tieren gewonnenen Materialien, wie z.B. Serum, mit zahlreichen Nachteilen behaftet [3]. Enthält das Kultursystem keine Serumproteine, ist für die Kultivierung von hMSCs eine zusätzliche

Beschichtung auf der Kulturoberfläche notwendig, die die Zelladhäsion unterstützt. Dabei sind die häufig eingesetzten Beschichtungen biologischen Ursprungs und naturgemäß komplex und undefiniert, was die Reproduzierbarkeit von Experimenten beeinträchtigen kann.

Die FN1 motifs Oberfläche besteht aus synthetischen, von RGD abgeleiteten Motiven, die spezifisch konzipiert wurden, um die Zellanheftungsstellen natürlicher Proteine der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibronectin, zu imitieren. Kombiniert mit synthetischen Kulturmedien und Dissoziationslösungen, ist diese Oberfläche eine effektive synthetische Alternative zu biologischen Beschichtungen. Da sie gebrauchsfertig ist, reduziert sich zudem der Aufwand und damit die Arbeitszeit.

Hier zeigen wir, dass die FN1 motifs Wachstums Oberfläche in Kombination mit verschiedenen xeno-freien Medien sowohl für eine erfolgreiche kurzzeitige als auch langfristige Expansion von aus Knochenmark gewonnenen hMSCs (hMSC-BM) geeignet ist.\*

## Ergebnisse und Diskussion

*Effiziente Expansion von hMSC-BM in verschiedenen xeno-freien Kulturmedien*

Die FN1 motifs Oberfläche unterstützt das effiziente Wachstum von hMSC-BM in Kombination mit unterschiedlichen xeno-freien (XF) Kulturmedien (Abb. 1).

In einem serumhaltigen Kultursystem adhären und proliferieren hMSCs in vergleichbarer Weise auf der FN1 motifs und TCT-Oberfläche. Auf beiden Oberflächen zeigen die Zellen ihre typische fibroblastenähnliche Morphologie.

In einem serumfreien Medium haben die hMSCs auf der TCT-Oberfläche Schwierigkeiten zu proliferieren, was auf die Notwendigkeit einer zusätzlichen adhäsionsfördernden Beschichtung schließen lässt. Im Gegensatz dazu unterstützt FN1 motifs die Adhäsion und das Wachstum von hMSCs effizient, unabhängig von den untersuchten Medien. Die Zellen zeigen die für eine xeno-freie Kultivierung charakteristische länglich-spindelförmige Morphologie [4].

*Robuste langfristige Expansion von hMSC-BM in einem vollständig definierten, synthetischen Kultursystem*

Um zu bestätigen, dass die FN1 motifs Oberfläche die langfristige Expansion von hMSC-BM in einem vollständig synthetischen Kultursystem unterstützt, ohne die Zellqualität zu beeinträchtigen,

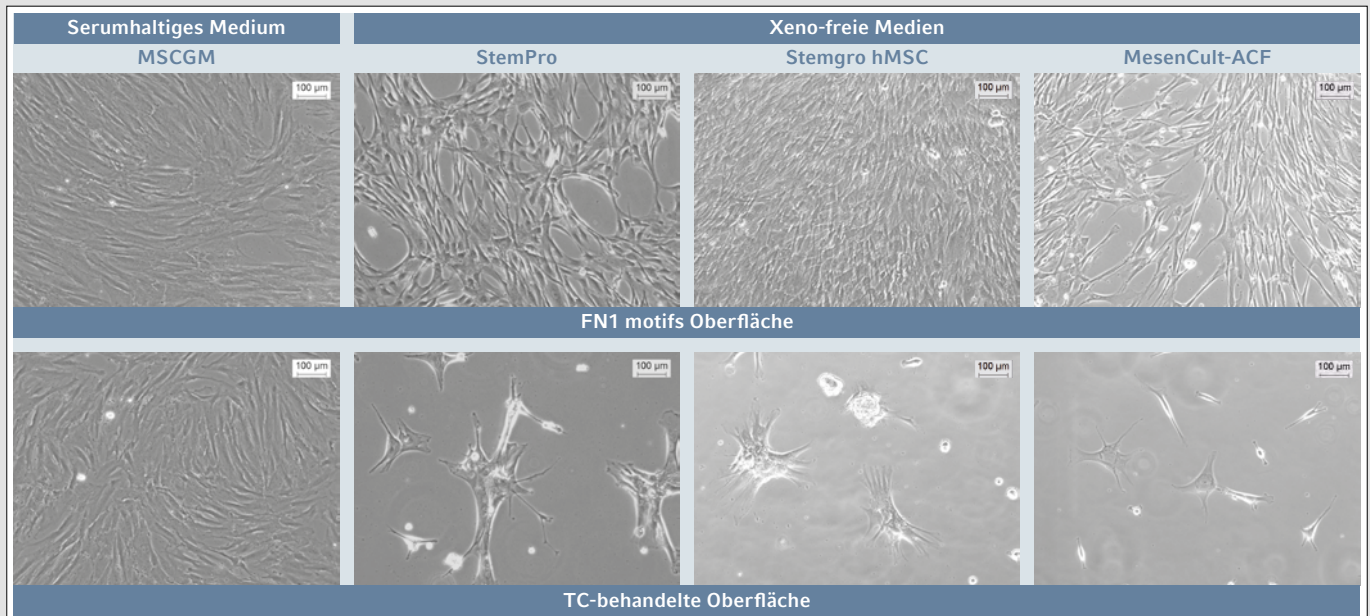


Abb. 1: hMSC-BM Morphologie nach kurzer Expansion auf der CCCadvanced FN1 motifs Oberfläche in verschiedenen Kulturmedien

## Robuste Expansion von humanen mesenchymalen Stammzellen mit der synthetischen CCCadvanced® FN1 motifs Wachstumsoberfläche

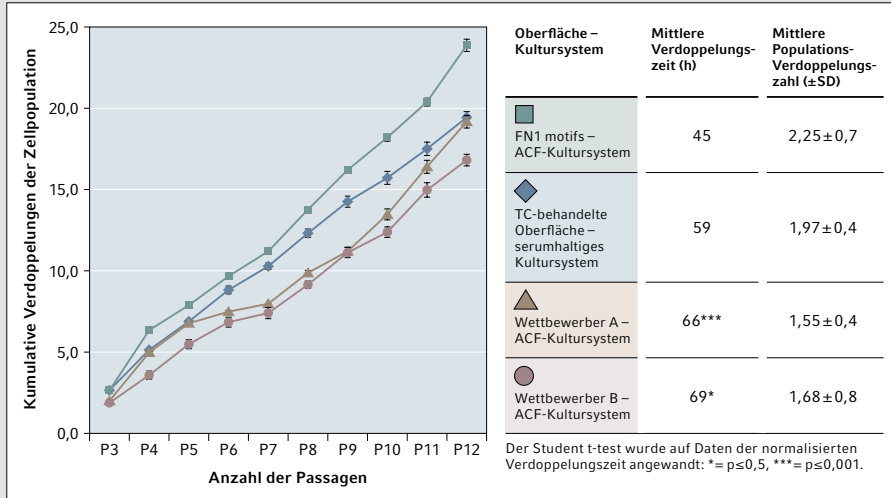


Abb. 2: Proliferationsrate der hMSCs im Laufe einer Langzeitexpansion in verschiedenen Kultursystemen ohne die Zugabe von tierischen Komponenten

wurden die Zellen über einen Zeitraum von 10 aufeinanderfolgenden Passagen auf der Oberfläche kultiviert. In einem Parallelansatz wurden die Zellen auf zwei anderen synthetischen Oberflächen kultiviert (gebrauchsfertig von Wettbewerber A und manuell beschichtet von Wettbewerber B).

Als Referenz wurden Zellen in einem konventionellen Kultursystem (TCT, serumhaltiges Medium und Trypsin/EDTA) expandiert. Die Proliferationsraten zeigen, dass FN1 motifs die robuste und beständige hMSC-Proliferation über den gesamten Kulturzeitraum unterstützt (Abb. 2).

Im Vergleich zu den anderen experimentellen Bedingungen zeigen die auf FN1 motifs expandierten Zellen eine signifikant schnellere Proliferationsrate mit kürzeren Verdoppelungszeiten sowie höherer Populations-Verdoppelungszahl.

Um die Beibehaltung ihrer charakteristischen Multipotenz nach langfristiger Expansion in einem synthetischen Kultursystem mit FN1 motifs als Wachstumsoberfläche zu bestätigen, wurden die expandierten hMSCs *in vitro* in osteogene, adipogene bzw. chondrogene Linien differenziert. Wie mittels Immunfluoreszenzfärbung in Abb. 3 gezeigt, behalten hMSC-BM auch nach mehreren

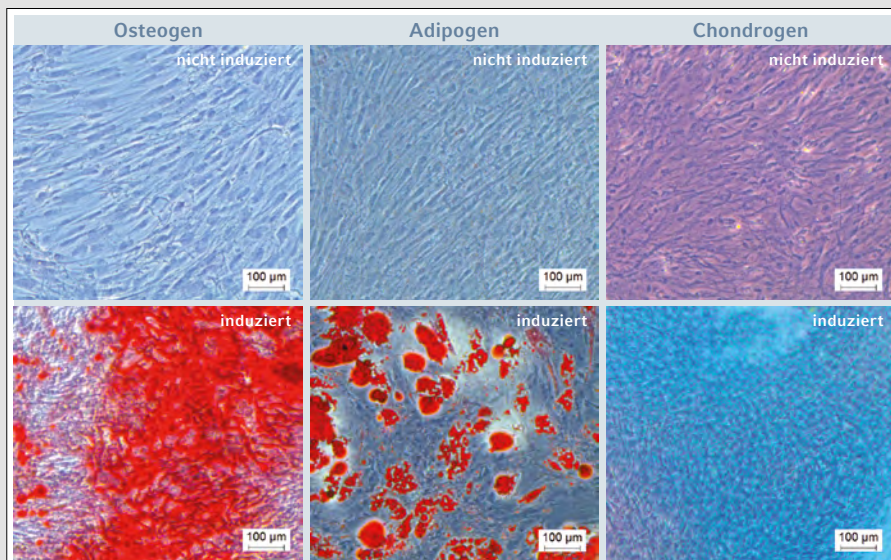


Abb. 3: Differenzierungspotenzial der hMSC-BM nach Expansion auf CCCadvanced FN1 motifs in einem Kultursystem ohne Zusatz tierischer Substanzen

Passagen auf der FN1 motifs Oberfläche ihr Differenzierungspotenzial bei. Parallel dazu wurde der hMSC-spezifische Immunphänotyp mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse bestätigen, dass hMSCs auch nach langfristiger Expansion auf FN1 motifs mesenchymale Marker exprimierten und negativ für hämatopoetische Marker blieben.

### Fazit

Die gebrauchsfertige CCCadvanced FN1 motifs Oberfläche von Eppendorf unterstützt eine langfristige Expansion von hMSC-BM in einem vollständig definierten Kultursystem. Während der gesamten Expansion behielten die hMSCs eine stabile und robuste Proliferationsrate und ihre typische hMSC-Morphologie bei. Zusätzlich zeigten die Zellen ihr charakteristisches Markerexpressionsprofil sowie ihr Differenzierungspotenzial auch nach mehreren Passagen in einem Kultursystem, dem keinerlei tierische Materialien zugesetzt worden waren.

FN1 motifs unterstützt somit eine effiziente hMSC-BM Proliferation in Kombination mit verschiedenen kommerziellen XF Kulturmedien und erleichtert die Etablierung einer definierten Umgebung für die Kultivierung von hMSCs.

\*Besuchen Sie [www.eppendorf.com/appnote390](http://www.eppendorf.com/appnote390) für detaillierte Angaben zu Material und Methoden.

### Literatur

[1] Bobis S *et al.* Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2006; 44 (4): 215-230

[2] Sharma RR *et al.* Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 2014; 54: 1418–1437.

[3] Karnieli O *et al.* A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy* 2017; 19: 155-169

[4] Dolley-Sonneville PJ *et al.* Synthetic surface for expansion of human mesenchymal stem cells in xeno-free, chemically defined culture conditions. *PLoS One* 2013; 8(8): e70263