Verbundprojekt

Regenerative potential of mesenchymal stem cells (MSC)

Abschlussbericht

Teilprojekt VIa: Materials to control MSC in culture

Projekt des BMBF

Förderkennzeichen: 01GN0946

Prof. Dr. Carsten Werner

Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.

Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien e.V.

November 2012

Abschlussbericht

Verbundprojekt: Regenerative potential of mesenchymal stem cells (MSC)

Teilprojekt VIa: Materials to control MSC in culture (IPF Dresden)

1 Allgemeine Angaben

Förderkennzeichen:	01GN0946
Projektleiter:	Prof. Dr. Carsten Werner
Institution:	Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.
	Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien Dresden e.V.
Thema:	Regenerative potential of mesenchymal stem cells (MSC)
	Teilprojekt VIa: Materials to control MSC in culture
Berichtszeitraum:	5/2009 - 4/2012
Förderzeitraum:	5/2009 - 4/2012

2 Zusammenfassung

Ziel des Teilprojektes war es das Potenzial von polymeren Hydrogelmaterialien hinsichtlich ihres Einsatzes in der Isolierung, Expansion und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen. Dafür sollten verschiedene polymere Hydrogelschichten entwickelt und charakterisiert sowie mit Adhäsionsliganden modifiziert werden. Im Rahmen des Projektes konnten zwei Materialplattformen entwickelt und charakterisiert werden, auf deren Basis nun Weiterentwicklungen erfolgen. Einerseits konnten starPEG-Heparin-Hydrogelschichten mit unterschiedlichen Vernetzungsarten und -graden sowie Funktionalisierungsgraden hergestellt werden, welche es erlauben die mechanischen Eigenschaften sowie die Adhäsionseigenschaften für eine Vielzahl von adhärenten Zellen einzustellen. Des Weiteren konnten Polyacrylamid-Hydrogelschichten mit abgestuften physisorptiven Funktionalisierungsmechanismen entwickelt werden, welche neben der Substratmechanik und der Ligandenspezifität, die Mobilität der Adhäsionsliganden als Variationsparameter ermöglicht. Neben den Untersuchungen zur Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen auf diesen Zellkulturträgeren konnte ebenfalls deren Einsatz für die Kultur anderer Zelltypen gezeigt werden. Die Zellkulturexperimente erfolgten in enger Zusammenarbeit mit anderen Partnern des Verbundprojektes, insbesondere mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Martin Bornhäuser und Prof. Dr. Peter Dieter (beide Medizinische Fakultät der TU Dresden).

3 Arbeits- und Ergebnisbericht

3.1 Einleitung

Das Teilprojekt VIa diente der Entwicklung polymerer Hydrogelschichten, welche als multifunktionelle Zellkulturträger die Stimulation von mesenchymalen Stammzellen in Kultur unterstützen sollten. Die Forschungsarbeiten zu diesem Projekt liefen von Mai 2009 bis April 2012, die dabei etablierten Materialsysteme werden aktuell für andere Anwendungen weiterentwickelt. Die Arbeiten zu diesem Teilprojekt wurden durch Frau Dipl.-Biol. Katja Schneider durchgeführt, die durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe unterstützt wurde. Die Ergebnisse der wissenschaftlichen Arbeit wurden bereits in internationalen Fachzeitschriften publiziert, eine weitere Publikationen ist in Vorbereitung.

3.2 Darstellung der Ergebnisse und Meilensteine

3.2.1 Meilenstein 1: Entwicklung und Charakterisierung eines kombinatorischen Satzes von Polymerhydrogelschichten

Aufgabe 1.1: Synthese und Charakterisierung von Polymer-Hydrogelschichten

Im Fokus des Teilprojektes standen zwei grundsätzlich verschiedene Hydrogelsysteme, die es ermöglichen ein weites Spektrum von exogenen Signalen einzustellen um Zellen in Kultur gezielt beeinflussen zu können.

Einerseits wurden Hydrogel-Netzwerke aus sternförmigem Polyethylenglykol und Heparin (starPEG-Heparin) als Dünnschichten auf Glasträgern präpariert werden. Durch die Abstufung des Vernetzungsgrades konnten deren elastische Eigenschaften eingestellt werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels rheologischer Untersuchungen. Der Schermodulus der Hydrogelschichten liegt im Bereich von 1 kPa bis 15 kPa, siehe Abbildung 1A. Gleichzeitig konnte erreicht werden, dass die Hydrogelschichten der verschiedenen Präparationen in ähnlicher Schichtdicke von ca. 50 µm vorliegen, was für die nachfolgenden Zellkulturexperimente von Bedeutung ist. Das entwickelte Hydrogelsystem besitzt zudem die wichtige Eigenschaft, dass die Konzentration der funktionalen Komponente Heparin in allen Materialien unabhängig von den mechanischen Eigenschaften und dem Vernetzungsgrad konstant ist, siehe auch Abbildung 1A. Da diese Komponente zur Kopplung von Adhäsionsliganden und löslichen Mediatoren der Zellkultur genutzt werden kann, bietet das Hydrogelschichtsystem damit die Möglichkeit, die mechanischen Eigenschaften unabhängig von der Funktionalisierung einzustellen. Weitere Details zu den Eigenschaften dieses polymeren Hydrogelschichtsystems finden sich in einer Publikation (Freudenberg et al. Adv Funct Mater 2012). Weitere Untersuchungen belegten, dass die Schichtsysteme über erforderliche Zeiträume von bis zu 4 Wochen unter Zellkulturbedingungen stabil und homogen bleiben.

Ausgehend von dem zuerst etablierten Syntheseweg wurden weitere Varianten der Hydrogelschichten mit abgestuften mechanischen Eigenschaften hergestellt, welche über zellkompatible Mechanismen vernetzt werden und somit *in situ* (unter Einbettung von Zellen) geliert werden können. Zudem konnte auch eine einstellbare, durch zelluläre Enzyme gesteuerte Abbaubarkeit der Hydrogele realisiert werden. Parallel dazu wurden die Einflüsse der Hydrogelschichten auf die Zellkulturbedingungen untersucht, indem das Bindungsverhalten wichtiger Wachstumsfaktoren der Zellen aus dem Medium charakterisiert wurde. Diese Weiterentwicklungen und Charakterisierungen sind für den Einsatz in *in vitro* und *in vivo* Zellkulturexperimenten von großer Bedeutung und erweitern das Anwendungspotenzial der starPEG-Heparin-Hydrogelschichten.

Neben der Entwicklung der starPEG-Heparin-Hydrogelschichten konnte eine zweite Hydrogel-Plattform auf Basis von vernetztem Polyacrylamid etabliert werden. Mit dieser können die mechanischen Eigenschaften in einem großen Bereich des E-Moduls von 500 Pa bis 25 kPa abgestuft werden, wobei ein Beispielsystem in Abbildung 1B gezeigt ist. Zusätzlich sind diese Hydrogelschichten mit verschiedenen Maleinsäureanhydrid-Copolymeren beschichtet worden, was es erlaubt die Affinität verschiedener Adhäsionsliganden neben einer kovalenten Anbindung auch durch physisorptive Adsorption zu variieren. Damit ergibt sich die Möglichkeit neben der kovalenten Anbindung von Adhäsionsliganden (starPEG-Heparin-Hydrogelsystem), den Einfluss einer unterschiedlich starken physisorptiven Verankerung und einer damit verbundenen Modulierung der Ligandenmobilität unabhängig von den mechanischen Eigenschaften zu adressieren.

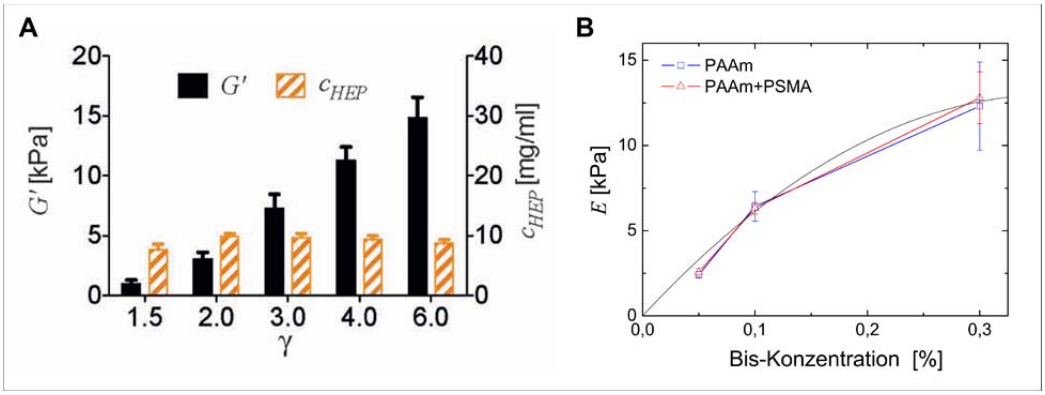

Abbildung 1. Charakterisierung der starPEG-Heparin sowie Polyacrylamid-Hydrogelschichten. A) Rheologische Charakterisierung (G' - Schermodul) sowie konstanter Heparin-Anteil (c_{HEP}) der starPEG-Heparin Hydrogelschichten. B) Elastische Eigenschaften (E - E-Modul) der Polyacrylamid-Hydrogelschichten mit und ohne Oberflächenmodifizierung mittels Maleinsäureanhydrid-Copolymeren (PSMA - Poly(styren-*alt*-maleinsäure anhydrid)) mittels Rasterkraftspektroskopie.

Aufgabe 1.2 Kopplung von Zelladhäsionsliganden und Charakterisierung

Im Anschluss an die Herstellung und Charakterisierung der Polymer-Hydrogelschichten hinsichtlich Zusammensetzung und mechanischen Eigenschaften wurden diese kovalent oder durch physisorptive Anbindung mit Adhäsionsliganden modifiziert. Dabei wurde ein Spektrum von verschiedenen Liganden einschließlich der Matrixproteine Kollagen I, Laminin, Fibronektin sowie des spezifischen Peptids (RGD) über Konzentrationsbereiche getestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die großen Proteine der extrazellulären Matrix nur an der Oberfläche gebunden werden, aus diesen abgeleitete RGD-Peptide jedoch auch im Inneren der starPEG-Heparin-Hydrogelschichten immobilisiert werden. In diesem Falle kann eine maximale Beladung mit 0,4 mol RGD-Peptid pro 1 mol Heparin erreicht werden. Der Nachweis der Beladungskonzentration erfolgte mittels quantitativer Aminosäureanalytik/HPLC. In Abhängigkeit der Lösungskonzentration während der Kopplung kann die Funkionalisierungsdichte beliebig herabgesetzt werden. Da die RGD-Peptide reaktiv an die Heparinmoleküle des Hydrogels gekoppelt werden, gewährleistet deren konstanter Heparingehalt eine einheitliche Funktionalisierung der Hydrogelschichten bei variabler Elastizität. Die unterschiedliche physisorptive Bindung von Matrixproteinen an den oberflächenmodifizierten Polyacrylamid-Hydrogelen wurde in Verdrängungsexperimenten mit zellkulturähnlichen Konzentrationen von Serumalbumin mittels Radioisotop-markierten Fibronektin nachgewiesen werden.

Versuche mit verschiedenen adhäsionsabhängigen Zellen auf den verschieden modifizierten Hydrogelschichten belegten eine funktionale Kopplung dieser Adhäsionsliganden und eine Steuerbarkeit der Zelladhäsion in Abhängigkeit der Belegungskonzentration und Affinität mit diesen Liganden, siehe auch Kapitel 3.2.2.

3.2.2 Meilenstein 2: Bestimmung von spezifischen Materialeigenschaften der funktionalisierten Polymer-Hydrogelschichten für die MSC Kultur

Aufgabe 2.1 Kultur von MSC auf kombinatorischen Hydrogelschichten

Die oben beschriebenen Polymer-Hydrogelschichten wurden in verschiedenen Zellkulturexperimenten mit mesenchymalen Stammzellen eingesetzt.

Wie in Abbildung 2 gezeigt, erwiesen sich beide Hydrogelsysteme als effektiv zur Untersuchung des Verhaltens humaner mesenchymaler Stammzellen über längere Zeiträume. Neben der Expansion der mesenchymalen Stammzellen konnte auch deren Differenzierung in Knochenzellen (Osteoblasten) untersucht werden. Dabei wurde quantitativ herausgearbeitet, dass die mechanischen Eigenschaften der Zellkulturträger die Differenzierung in synergistischer Weise gemeinsam mit anderen Faktoren, wie der Anwesenheit des Wachstumsfaktors BMP-2, beeinflussen (Freudenberg et al. 2012).

Weitere, gegenwärtig in erweiterter Form fortgeführte Experimente demonstrierten die Eignung der Gel-Matrices zur Stimulation der chondrogenen Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen unter entsprechender Anpassung der Adhäsivität und Zytokin-Freisetzung.

Experimente zur Isolation von mesenchymalen Stammzellen mit Hilfe der entwickelten Materialien erwiesen sich trotz umfangreicher, systematischer Untersuchungen im Vergleich mit der konventionellen Gewinnung der Zellen über Adhärenz an plasmabehandelte Polystyren-Oberflächen als nicht zielführend, da sich sowohl die Abtrennung von anderen Zellen als auch die Expansion der MSC an den untersuchten Hydrogel-Matrices als nicht effektiv genug erwiesen. Aufgrund der gleichzeitig bestehenden Notwendigkeit zur Unterstützung von Kooperationsaktivitäten im Rahmen des Verbundes wurde daher - ausgehend von den etablierten Hydrogel-Plattformen - die Entwicklung von Funktionalisierungskonzepten für die Stimulation von mesenchymalen Stammzellen in Differenzierungs- und Cokultur-Experimenten in den Mittelpunkt gestellt.

Dies erwies sich als zweckmäßig, da es so möglich wurde, einen neuartigen Ansatz zur Cokultur von mesenchymalen Stammzellen und β-Inselzellen in dreidimensionalen Hydrogel-Scaffolds zu erkunden, die durch Cryo-Gelierungsverfahren erhalten wurden (Kooperation mit Prof. Ezio Bonifacio, s. auch Bericht zu dem von ihm geleiteten Teilprojekt des Verbundes, Publikation in Vorbereitung) und da Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Marc Schmitz zur immunmodulatorischen Wirkung von Polymermatrices auf mesenchymale Stammzellen unterstützt werden konnten (Wehner et al. Tiss Eng Reg Med 2012)

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden bisher in zwei Artikeln in Fachzeitschriften publiziert (Freudenberg et al. Adv Funct Mater 2012, Wehner et al. Tiss Eng Reg Med 2012).

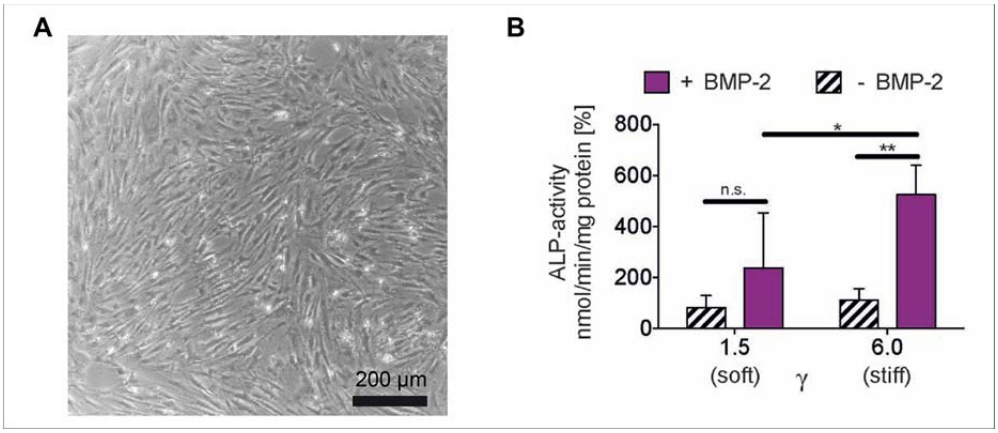

Abbildung 2. Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen auf Polymerhydrogelschichten. (A) Phasenkontrastbild von mesenchymalen Stammzellen auf oberflächenmodifizierten Polyacrylamid-Hydrogelschichten nach 2 Wochen Kultur. (B) Differenzierung (ALP-Aktivität) von mesenchymalen Stammzellen auf weichen und harten starPEG-Heparin-Hydrogelschichten zu Osteoblasten mit und ohne zusätzliche Stimulanz mittels der Wachstumsfaktors BMP-2.

Aufgabe 2.3 Optimierung der Polymer-Hydrogelschichten

Wie unter 3.2.1 erwähnt wurden die Polymer-Hydrogelschichten ausgehend von den ersten Zellkulturversuchen mit mesenchymalen Stammzellen und anderen Zelltypen weiterentwickelt. Dabei waren sowohl zellkompatible Vernetzungsmechanismen, die eine dreidimensionale Einbettung und definierte Stimulation von Zellen ermöglichen als auch spezielle Funktionalisierungsprotokolle zur zellulären, enzymatisch gesteuerten Reorganisation der Hydrogel-Matrices und modulierten Präsentation von matrixbindenden Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren zu implementieren, um die Einsatzmöglichkeiten der Materialplattformen für spezifische Anwendungen zu erweitern. Darüber hinaus wurde eine Cryo-Gelierungsmethode zur Erzeugung von makroporösen Gel-Matrices entwickelt, die die Kultur und Cokultur von Zellen im Inneren von Gel-Volumenkörpern verschiedenster Form ermöglicht.

Die entsprechenden Arbeiten konnten während der Laufzeit des Projektes weitgehend zum jeweils angestrebten Ergebnis gebracht werden und stehen nun für weiterführende, translationale Forschungsansätze zur Verfügung.

3.3 Veröffentlichungen im Rahmen des Teilprojektes

- Freudenberg, U.; Sommer, J.-U.; Levental, K. R.;. Welzel, P. B.; Zieris, A.; Chwalek, K.; Schneider, K.; Prokoph, S.; Prewitz, M.; Dockhorn, R.; Werner, C. Using mean field theory to guide biofunctional materials design. 2012, **Advanced Functional Materials** 22, 1391-1398.

- R. Wehner **Wehner R**, Taubert C, Mende T, Gaebler C, de Andrade AV, Bornhäuser M, Werner C, Tonn T, Schäkel K, Bachmann M, Schmitz M. : Engineered extracellular matrix components do not alter the immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells in vitro. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. 2012 doi: 10.1002/term.1500.

Geplante Veröffentlichungen

- D. Borg, P. Welzel, U. Freudenberg, C. Werner, E. Bonifacio “Cryogel matrices to enable the co-culture of mesenchymal progenitor cells and beta islets“

4 Unterschrift

Prof. Dr. Carsten Werner

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht

3. Titel

Verbundprojekt: Regenerative potential of mesenchymal stem cells (MSC)
Teilprojekt VIa: Materials to Control MSC in culture

4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Prof. Dr. Carsten Werner	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.04.2012
	6. Veröffentlichungsdatum 23.11.2012
	7. Form der Publikation Bericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e. V. Hohe Str. 6 01069 Dresden	9. Ber. Nr. Durchführende Institution --
	10. Förderkennzeichen *) 01GN0946
	11. Seitenzahl 7
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	12. Literaturangaben 9
	14. Tabellen 0
	15. Abbildungen 2

16. Zusätzliche Angaben
--

17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)
--

18. Kurzfassung

Ziel des Teilprojektes war es, das Potenzial von polymeren Hydrogelmaterialien hinsichtlich ihres Einsatzes in der Isolierung, Expansion und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen. Dafür sollten verschiedene polymere Hydrogelschichten entwickelt und charakterisiert sowie mit Adhäsionsliganden modifiziert werden. Im Rahmen des Projektes konnten zwei Materialplattformen etabliert werden, auf deren Basis nun Weiterentwicklungen in verschiedenen laufenden Projekten erfolgen. Einerseits konnten starPEG-Heparin-Hydrogelschichten mit unterschiedlichen Vernetzungsarten und -graden sowie Funktionalisierungsgraden hergestellt werden, welche es erlauben, die mechanischen Eigenschaften sowie die Adhäsionseigenschaften für eine Vielzahl von adhärenten Zellen unabhängig voneinander einzustellen. Des Weiteren konnten Polyacrylamid-Hydrogelschichten durch abgestufte physisorptive Funktionalisierung hinsichtlich Substratmechanik, Ligandenspezifität und Mobilität der Adhäsionsliganden variiert werden. Neben Untersuchungen zur Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen auf diesen Zellkulturträgern wurde auch deren Einsatz für die Kultur anderer Zelltypen erprobt. Die Zellkulturexperimente erfolgten in enger Zusammenarbeit mit anderen Partnern des Verbundprojektes, insbesondere mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Martin Bornhäuser und Prof. Dr. Peter Dieter (beide Medizinische Fakultät der TU Dresden).

19. Schlagwörter
--

20. Verlag --	21. Preis --

*) Auf das Förderkennzeichen des BMBF soll auch in der Veröffentlichung hingewiesen werden.