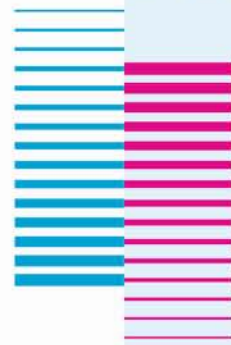


Stiftung zur Förderung
der Erforschung von
Ersatz- und
Ergänzungsmethoden
zur Einschränkung von
Tierversuchen

set



Projekt

Humane Thrombozytenextrakte als Serum-Ersatz in der
Kultivierung von Stammzellen in *In-vitro*-Toxizitätstests

Prof. Dr. Gerhard Gstraunthaler & Mag. Dr. Caroline Rauch, Universität Innsbruck (Österreich)

05/2011 – 12/2013



3R reduce
refine
replace

Mainzer Landstraße 55
60329 Frankfurt/Main
Telefon 069-2556-1226
www.stiftung-set.de
info@stiftung-set.de

www.stiftung-set.de

Humane Thrombozytenextrakte als Serum-Ersatz in der Kultivierung von Stammzellen in *In-vitro*-Toxizitätstests

Die Verwendung von fetalem Kälberserum in der Zellkultur

Die Verwendung von Seren als Zusatz zu Wachstumsmedien ist weltweite Routine in der Zell- und Gewebekultur. Seren versorgen die Kulturen mit Hormonen, Wachstums- und Anheftungsfaktoren, Bindungs- und Transportproteinen, zusätzlichen Aminosäuren, anorganischen Salzen, Spurenelementen sowie Puffer- und Neutralisationssystemen (z. B. Proteaseinhibitoren). Ferner werden mit dem Serum auch Fettsäuren und Lipide in das Kulturmedium eingebracht.

Die Verwendung von fetalem Kälberserum birgt aber auch eine Reihe von Nachteilen. Seren können toxische Stoffe (z. B. Umweltgifte), bakterielle Toxine (Endotoxine) und unerwünschte Mikroorganismen wie Pilze (Hefen), Bakterien (einschließlich Mycoplasmen), Viren und Prionen enthalten. Darüber hinaus finden sich enorme jahreszeitliche und geographische Schwankungen in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung einzelner Serum-Chargen.

Der gravierendste Nachteil ist allerdings die Methode der Serumgewinnung. Fetales Kälberserum wird von Föten trächtiger Kühe gewonnen. Es wird angenommen, dass weltweit jährlich ca. 500.000 Liter fetales Kälberserum benötigt werden, was der Tötung von rund 1 Mio. Rinderföten entspricht.

In den letzten Jahren sind besonders die ethischen Bedenken gegenüber der Serumgewinnung immer lauter geworden und es wurden eine Reihe an Alternativen aufgezeigt, um durch eine Verringerung im Verbrauch bzw. durch den vollständigen Ersatz von fetalem Kälberserum die jährlichen Verbrauchszahlen an Rinderföten im Sinne der 3R zu senken.

Humane Thrombozytenextrakte als Serum-Alternative in der Zell- und Gewebekultur

Wir konnten kürzlich in einem umfangreichen Projekt zeigen, dass Extrakte humaner Thrombozyten als vollwertiger Ersatz für fetales Kälberserum in einer Vielzahl unterschiedlicher Kultursysteme dienen können. Thrombozyten (Blutplättchen) produzieren eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die sie in ihren α -Granula speichern und nach Aktivierung freisetzen (Abb. 1). Der hohe Gehalt an spezifischen Wachstumsfaktoren macht humane Thrombozytenextrakte zu einem hervorragenden Ersatzprodukt für die Zell- und Gewebekultur, besonders für Zellen humanen Ursprungs und in der Stammzellkultur.

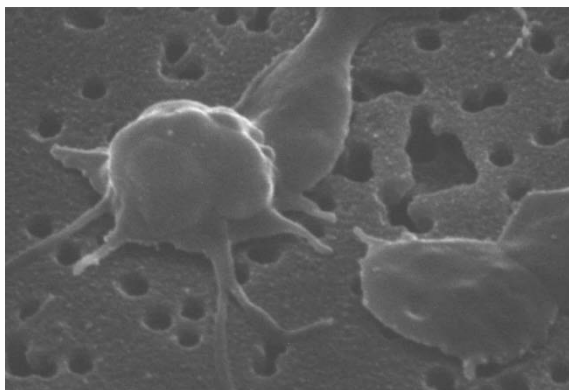


Abb. 1. Aktivierter Thrombozyt mit charakteristischen Pseudopodien.

Kultivierung embryonaler und adulter Stammzellen.

Um Stammzellen im undifferenzierten Stadium zu halten bzw. um ihre Pluripotenz über viele Passagen in Kultur zu bewahren, mussten murine und humane ES-Linien bislang unter anspruchsvollen und z. T. schwierigen Kulturbedingungen in Serum-haltigem Medium und auf Nähzzellen (Feeder Layer) gehalten werden (Abb. 2).

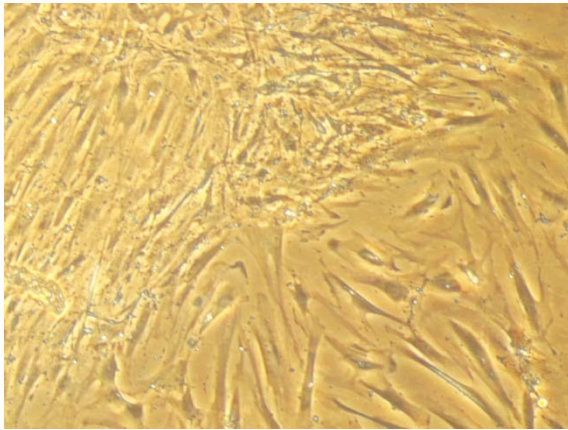


Abb. 2. Humane mesenchymale Stammzellen (konfluente Kultur)

Ein großes Problem ergab sich aus der zukünftigen Verwendung humaner ES-Zellen, da die Kulturen auf Feeder Layer aus inaktivierten Maus-Fibroblasten und unter hohen Konzentrationen (20 %) an fetalem Kälberserum kultiviert wurden. Deshalb bestand die Gefahr der Übertragung xenobiotischer Pathogene der Maus auf Humanzellen, weshalb die Zellen im Falle eines therapeutischen Einsatzes von der Nationalen Zulassungsbehörde der USA (Food and Drug Administration, FDA) als Xenotransplantat eingestuft wurden.

Ferner wurde entdeckt, dass praktisch alle derzeit bestehenden humanen Stammzell-Linien die nur bei Tieren vorkommende N-Glycolyl-Neuraminsäure (Neu5Gc) in die Zellmembran eingebaut haben. Neu5Gc stammt aus dem fetalen Kälberserum des Kulturmediums, wird von den humanen Stammzellen aufgenommen und als Sialinsäurerest eingebaut. Die Zellen sind deshalb stark antigenisch aktiv.

Stammzell-basierte *In-vitro*-Toxizitätstest.

Die mit großer Dynamik stattfindende Entwicklung in der Stammzell-Technologie machte bald klar, dass innovative, Stammzell-basierte Testsysteme entscheidende Fortschritte in der *in vitro*-Toxikologie bringen können. Humane Stammzellkulturen liefern *In-vitro*-Systeme, mit welchen die Wirkung von Chemikalien und Giftstoffen auf Entwicklungsprozesse, Differenzierung und Stoffwechsel und deren Regulation in innovativen Ansätzen identifiziert werden sollen. Die im 7. Rahmenprogramm der EU geförderten Projekte ReProTect (www.reprotect.eu), ESNATS (www.esnats.eu) und SCR&Tox (www.scrtox.eu) belegen diese Entwicklung. Neben dem bereits validierten Embryonalen Stammzelltest der Maus (EST) werden demnächst neu entwickelte Stammzell-basierte *In-vitro*-Toxizitätstests das Stadium der

Prävalidierung bzw. Validierung erreichen. Diese im Sinne der 3R notwendige und erfreuliche Entwicklung soll mit diesem Projekt vorangetrieben werden.

Geplante Arbeiten

Im vorliegenden Projekt sollen die von uns erarbeiteten Methoden zur Gewinnung geeigneter Thrombozytenextrakte an Stammzellkulturen unterschiedlicher Provenienz (humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark bzw. Fettgewebe, embryonale Mausstammzellen) ausgetestet werden. In weiterer Folge sollen die unter den gewählten Bedingungen kultivierten Stammzellen auf ihre Eignung als innovative in vitro-Testsysteme geprüft werden.

Folgende Fragen stehen dabei im Vordergrund:

- Können Stammzellen mit Thrombozytenextrakten als Serumersatz kultiviert werden?
- Können Stammzellen mit Thrombozytenextrakten im undifferenzierten, pluripotenten bzw. oligopotenten Stadium gehalten werden?
- Können Stammzellen mit Thrombozytenextrakten in verschiedene, spezialisierte Zelltypen (tissue lineages) ausdifferenzieren?
- Kann z. B. der Embryonale Stammzelltest (EST) unter den obengenannten Kulturbedingungen durchgeführt werden? Sind die Ergebnisse vergleichbar?

Projektabschluss

Das Forschungsprojekt konnte mit 31. 12. 2013 erfolgreich abgeschlossen werden.

Die eingangs gestellten Fragen

- Können Stammzellen mit Thrombozytenextrakten als Serumersatz kultiviert werden?
- Können Stammzellen mit Thrombozytenextrakten im undifferenzierten, pluripotenten bzw. oligopotenten Stadium gehalten werden?
- Können Stammzellen mit Thrombozytenextrakten in verschiedene, spezialisierte Zelltypen (tissue lineages) ausdifferenzieren?

konnten alle positiv beantwortet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass adulte Stammzellen aus abgesaugtem Fettgewebe (adipose-derived stem cells, ADSC) mit Thrombozytenextrakten als Serumersatz erfolgreich kultiviert werden können und die Zellen unter diesen Kulturbedingungen ihren undifferenzierten, oligopotenten Status beibehalten (Rauch *et al.*, 2014a).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ADSC unter den gewählten Kulturbedingungen ihr Differenzierungspotential in mesodermale Gewebelinien beibehalten haben (Rauch *et al.*, 2014b).

Publikationen

Die Ergebnisse wurden in zwei umfassenden Originalarbeiten publiziert, die als open access abgerufen werden können:

Rauch C., Wechselberger J., Feifel E. and Gstraunthaler G. Human Platelet Lysates Successfully Replace Fetal Bovine Serum in Adipose-derived Adult Stem Cell Culture. J. Adv. Biotechnol. Bioeng. 2(1): 1-11, 2014a.

<http://www.synergypublishers.com/downloads/jabbv2n1a1/>

Rauch C., Feifel E., Flörl A., Pfaller K. and Gstraunthaler G. Human Platelet Lysates Promote the Differentiation Potential of Adipose-derived Adult Stem Cell Cultures J. Adv. Biotechnol. Bioeng. 2(2): 39-48, 2014b.

<http://www.synergypublishers.com/downloads/jabbv2n2a1/>

Projektleiter



Univ.-Prof. Dr. Gerhard Gstraunthaler

Jahrgang 1953. Studium Mikrobiologie/Biochemie. 1987 Habilitation für Physiologie / Zellphysiologie, 1994 Titularprofessor am Institut für Physiologie, Medizinische Universität Innsbruck. 1984/85 Forschungsaufenthalte an den National Institutes of Health, Bethesda, MD, und 1995 an der Colorado State University. Spezialgebiete: Zellphysiologie, Nierenbiochemie, epitheliale Zell- und Gewebekultur, allg. Aspekte der Zell- und Gewebekultur (Serum-freie Zellkultur, Good Cell Culture Practice), Ersatzmethoden zu Tierversuchen. Mitautor des Buches „Zell- und Gewebekultur“, Spektrum Verlag, Heidelberg.

Mitarbeiterin



Mag. Dr. Caroline Rauch

Studium der Biologie/Zoologie an der Universität Innsbruck, Diplom 2005, Dissertation am Institut für Physiologie über „Humane Thrombozytenextrakte als Serumersatz in der Zell- und Gewebekultur“, Promotion 2010, derzeit: Post-Doc am Institut für Physiologie der Medizinischen Universität Innsbruck.

Ausführende Institution

Medizinische Universität Innsbruck
Fritz-Pregl-Straße 3
A-6020 Innsbruck

Förderungszeitraum

01.05.2011 – 30.04.2013