

## **Bericht zur Max-Buchner-Forschungsarbeit**

*„Identifizierung kritischer Prozessparameter für die Herstellung extrazellulärer Vesikel“  
(MBFSt-Kennziffer: 3776)*

Kreß Sebastian, Institut für Zell- und Gewebekulturtechniken,  
Department für Biotechnologie, Universität für Bodenkultur, Wien

### **1. Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Zur Therapie degenerativer Krankheiten und zur Stimulation von regenerativen Prozessen rücken extrazelluläre Vesikel immer weiter in den Fokus.

In den letzten Jahren wurden viele Stammzelltherapien entwickelt, die großes Potential versprochen Krankheiten zu heilen, welche trotz modernster chirurgischer Methoden und pharmazeutischer Fortschritte nicht heilbar waren. Stammzellbehandlungen sollten den Verlauf der Gewebedegeneration stoppen und die Regeneration einleiten bis zur vollständigen Wiederherstellung von Organfunktionen. Allerdings stellte sich heraus, dass viele Stammzelltherapien ineffektiv sind [1] und selbst autologe Stammzellen unvorhergesehene Risiken, wie zum Beispiel immunologische Abstoßungsreaktionen [2] oder die Entartung von Zellen, mit sich bringen können.

Die bisher etablierteste Zellquelle für zellbasierte Therapien stellen mesenchymale Stammzellen (MSCs) dar [3]. Diese sind multipotente Stammzellen aus adultem Gewebe. Diese spielen eine wichtige Funktion in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, was sie zu kritischen Parametern in der Wundheilung und Steuerung der Immunreaktion [4] macht.

Im Zuge der Untersuchung der Wirkungsweisen und Mechanismen von Stammzelltherapien wurde entdeckt, dass ein wichtiger Faktor der Signal- und Informationsübertragung zur Regeneration von Gewebe Stammzell-produzierte Extrazelluläre Vesikel (EV) darstellen [5]. EVs sind Membranpartikel, die von nahezu jeder Zelle sezerniert und von einer Vielzahl an Zellen wieder aufgenommen werden können. Sie transferieren ein komplexes Set an Informationen von einer Zelle zur anderen. EVs übermitteln so biologisch aktive Moleküle wie Proteine, Lipide oder RNA von Stammzellen an geschädigte Zellen und können so den Metabolismus der Zielzellen manipulieren, wodurch sie so therapeutische Effekte vermitteln [6]. Wenn EVs effektiv von den produzierenden Zellen isoliert und aufgereinigt werden, könnten deren regenerative Eigenschaften, ohne die üblicherweise bei Stammzell-Therapien auftretenden Risiken, genutzt werden [7].

Die Zell-freie Behandlung mit EVs ist eine vielversprechende Alternative zur Zelltherapie, die effektiver, sicherer und günstiger ist. Jedoch, wie die Effektivität der Stammzelltherapie vom Zustand der Ausgangszellen abhängig ist, ist auch die Beladung der Vesikel abhängig von Zelltyp und deren äußeren Einflüssen [6]. Die Kultivierungsbedingungen der produzierenden Zellen können also direkt die Beladung und damit den therapeutischen Effekt der EVs beeinflussen.

Deshalb ist das Ziel dieser Studie, die Beladung und Effektivität von EVs aus unterschiedlichen Kulturbedingungen zu untersuchen um diese Rückschlüsse für die gezielte EV-Herstellung nutzbar machen zu können.

### **2. Durchgeführter Arbeitsplan**

Als Zellquelle wurden MSCs aus Fett- und Nabelschnurgewebe verwendet, die aus humanem Spendergewebe isoliert wurden [8].

Durch unterschiedliche und gezielte Manipulation der Kulturbedingungen wurde untersucht welchen Einfluss diese auf die Herstellung und Beladung der EVs haben. Dabei wurden folgende Parameter variiert:

1. Medienkomponenten;
2. Kultur in 2D und 3D (Matrix-gebunden und Matrix-frei);
3. dynamische und statischen Kultur;
4. Sauerstoffsättigung (Normoxie und Hypoxie).

Zur Isolation und Aufreinigung von EVs wurden Ultra-Zentrifugation und Größenausschluss-Chromatografie verwendet sowie eine neue physikalische Methode evaluiert, die Partikel mittels akustischer Oberflächenwellen [9] auftrennt.

Zur Charakterisierung der EVs wurden deren physikalische Merkmale ermittelt, das Proteom der EV-Oberflächen und Cargo bestimmt, sowie funktionelle Test durchgeführt zur Untersuchung der Wirksamkeit. Größe, Morphologie und Konzentration wurde mittels Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) ermittelt. Oberflächenmarker der EVs wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt, molekulare Strukturen mittels Raman Spektroskopie und das Gesamt-Proteom sowohl von EV-Hülle als auch Beladung mittels Massenspektrometrie. Zur Überprüfung funktionaler Wirksamkeit wurden relevante Tests für die Wundheilung durchgeführt, dazu zählten die Stimulation von Migration, Angiogenese und Immunmodulation.

### 3. Ergebnisse

Zunächst wurde die 3D Kultur in den verschiedenen Varianten etabliert.

Sphäroid-Kulturen von MSCs wurden in speziellen konisch zulaufenden Platten etabliert, deren Größe über die Zahl der ausgesiedelten Zellen bestimmt werden konnte. Über die Kulturdauer kompaktierten die Sphäroide und die Zellen im Kern starben.

Das Einbetten von Zellen in 6% (w/v) Gelatin-Methacryloyl (GelMA) [10] stellte die größte Hürde dar, da hier die Zellen in 1-2 mm große Kügelchen eingegossen werden sollte, so dass der Diffusionsweg zum Inneren möglichst gering war und die dynamische Kultur ermöglicht. Damit sich einzelne Kügelchen abscheiden, wurden diese in einer Emulsion in Öl angesetzt und sofort polymerisiert bevor sich alles zu einem Gel vermischt. Dazu musste die Konzentration des Photoinitiator und die Bestrahlungsdauer der Zell-beladenen Gel-Kügelchen so abgestimmt werden, dass die Polymerisation einerseits so rasch und lange wie möglich abläuft, um das GelMA zu polymerisieren bevor sich die Kugeln vermengen, aber so kurz wie notwendig, um die Zellen nicht zu schädigen. Es wurde leider erst gegen Ende dieses Projekts ein geeigneter Photoinitiator gefunden, der in PBS gelöst werden kann und nah-UV-Licht zur Polymerisation nutzt. Dennoch konnte ein Protokoll zur Einbettung von MSCs in GelMA-Kügelchen mit einem Durchmesser von circa 2 mm etabliert werden, mit dem es in Zukunft möglich sein wird Zellen zur EV Produktion in Rühr-Reaktoren zu kultivieren. Diese wurden in einem ersten Ansatz bereits nach Polymerisation in einem Rühr-Reaktor dynamisch kultiviert. Die eingebetteten Zellen zeigten selbst nach einer Woche noch eine hohe metabolische Aktivität und Viabilität. Diese Methode birgt hohes Potenzial zum scale-up.

Die Kultur von MSCs auf einer xeno-freien hydrophilen PBT Matrix [11] sowie dessen Integration in ein Perfusions-Bioreaktor-System konnte schnell und reproduzierbar etabliert werden. Eine peristaltische Pumpe ermöglichte die Perfusion des Bioreaktors und damit eine dynamische Kultur. Dazu wurde die Zell-besiedelte Matrix so in den Bioreaktor eingespannt, dass das Medium die Matrix durchströmte. Dies ermöglichte einen vollständigen aktiven Austausch an Nährstoffen sowie Metaboliten über die Dicke der Matrix anstatt über passive Diffusion. Darüber hinaus konnten so sekretierte EVs effizient abtransportiert werden, was eine Aufreinigung erleichterte. Aufgrund der Vorteile der Matrixkultur und des Perfusions-Bioreaktors wurden die EV Sekretion zunächst in diesem System untersucht.

Für alle Kulturbedingungen wurde Zell-Viabilität und metabolische Aktivität von MSCs in den unterschiedlichen Kulturbedingungen ermittelt. Dabei zeigten die Zellen unter hypoxischen Bedingungen sowohl eine deutlich erhöhte Aufnahme von Nährstoffen als auch Abgabe von Metaboliten im Vergleich zu normoxisch kultivierten Zellen. Dies traf zu für 2D als auch 3D Kulturen. In allen Fällen war die metabolische Aktivität linear über die Zeit des Kulturverlaufs.

Sekretierte EVs wurden zunächst mittels NTA auf ihre morphologischen Eigenschaften hin untersucht. Die durchschnittliche Größe von EVs von MSCs aus 2D Kulturen war dabei signifikant höher von als EVs aus 3D Kulturen. Im Gegenzug war die Konzentration an sekretierten EVs in 3D Kulturen signifikant erhöht im Vergleich zu 2D Kulturen. Die Sauerstoffkonzentration während der Kultur nahm hierbei kaum Einfluss auf Größe und Menge von EVs.

Neben Größe und Konzentration sekretierter EVs wurde auch der Gesamt-Protein-gehalt der EVs bestimmt. Hier zeigten EVs, welche von MSCs in 2D unter Normoxie sekretiert wurden, den geringsten Gehalt an Protein. EVs aus 2D Kultur unter Hypoxie zeigten bereits 50% mehr Proteingehalt auf. EVs aus 3D Kultur unter Normoxie beinhalten dabei viermal mehr Protein als solche EVs aus 2D unter normoxischen Bedingungen. Das meiste Protein wiesen EVs auf, die von 3D kultivierten Zellen unter Hypoxie sekretiert wurden. Die Analyse der Proteine wurde mittels Massenspektrometrie untersucht um das Proteom der jeweiligen EVs zu bestimmen. Hierbei wurden deutliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Kulturbedingungen offensichtlich.

Unter Hypoxie hergestellte EVs zeigten eine signifikant höhere Induktion von Angiogenese und wiesen somit ein deutlich erhöhtes Wundheilungs-Potenzial auf.

#### 4. Fazit

Während die unterschiedlichen Kulturbedingungen der MSCs keinen signifikanten Einfluss auf Morphologie der sekretierten EVs hatten, konnte bei dynamischer Kultur die Quantität der geernteten EVs deutlich gesteigert werden im Vergleich zu statischer Kultur. Darüber hinaus zeigten EVs, welche unter physiologischen Bedingungen hergestellt wurden, eine erhöhte biologische Funktionalität.

Die Kultur von MSCs unter physiologischen Bedingungen ermöglicht die Sekretion von biologisch funktionellen EVs, während unter artifiziellen Kulturbedingungen die biologische Aktivität eingeschränkt war. Dies demonstriert den Einfluss der Kulturparameter auf die Funktionalität von EVs und stellt folglich die Bedeutung dieser für die Herstellung von EVs deutlich dar.

Für eine zukünftige potenzielle therapeutische Anwendungen muss es zu einer Umstellung der artifiziellen Standard-Kulturbedingungen hin zu physiologischer Zellkultur kommen. Für die gezielte Manipulation der EV-Beladung und Funktion durch weitere Variation der Kulturparameter, wie Medienkomposition oder Stimulation, sind weitere Untersuchungen notwendig.

#### 5. Literatur

- [1] A. Aslan, A. M. Allahverdiyev, M. Bagirova, and E. S. Abamor, "Problems in Stem Cell Therapy for Cardiac Repair and Tissue Engineering Approaches Based on Graphene and Its Derivatives," *Current Stem Cell Research & Therapy*, vol. 13, no. 6, pp. 447–457, Jul. 2018, doi: 10.2174/1574888X13666180510110055.
- [2] T. Deuse *et al.*, "De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans," *Nature Biotechnology*, vol. 37, no. 10, pp. 1137–1144, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0227-7.
- [3] T. Squillaro, G. Peluso, and U. Galderisi, "Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update," *Cell Transplantation*, vol. 25, no. 5. Cognizant Communication Corporation, pp. 829–848, 2016. doi: 10.3727/096368915X689622.

- [4] X. Wei, X. Yang, Z. P. Han, F. F. Qu, L. Shao, and Y. F. Shi, "Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 34, no. 6. pp. 747–754, Jun. 2013. doi: 10.1038/aps.2013.50.
- [5] H. Yu, K. Lu, J. Zhu, and J. Wang, "Stem cell therapy for ischemic heart diseases," *British Medical Bulletin*, vol. 121, no. 1. Oxford University Press, pp. 135–154, Jan. 01, 2017. doi: 10.1093/bmb/ldw059.
- [6] B. Zhang, R. W. Y. Yeo, K. H. Tan, and S. K. Lim, "Focus on extracellular vesicles: Therapeutic potential of stem cell-derived extracellular vesicles," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 2, Feb. 2016, doi: 10.3390/ijms17020174.
- [7] D. G. Phinney and M. F. Pittenger, "Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy," *Stem Cells*, vol. 35, no. 4, pp. 851–858, Apr. 2017, doi: 10.1002/stem.2575.
- [8] D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper, V. Weber, and V. Charwat, "Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells," *Cytometry Part A*, vol. 93, no. 1. Wiley-Liss Inc., pp. 19–31, Jan. 01, 2018. doi: 10.1002/cyto.a.23242.
- [9] C. Richard *et al.*, "Blood platelet enrichment in mass-producible surface acoustic wave (SAW) driven microfluidic chips," *Lab on a Chip*, vol. 19, no. 24, pp. 4043–4051, Dec. 2019, doi: 10.1039/c9lc00804g.
- [10] I. Pepelanova, K. Kruppa, T. Scheper, and A. Lavrentieva, "Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting," *Bioengineering*, vol. 5, no. 3, Sep. 2018, doi: 10.3390/bioengineering5030055.
- [11] O. Candini *et al.*, "A Novel 3D In Vitro Platform for Pre-Clinical Investigations in Drug Testing, Gene Therapy, and Immuno-oncology," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-43613-9.