

**Mesenchymale stromale Vorläuferzellen aus dem
Knochenmark zur Regeneration
chondrogener Gewebe
– eine *in vitro* Betrachtung**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin Jana Müller
aus Wittenberg

Tübingen
2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

14.07.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Burkhard Schlosshauer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Konrad Kohler

Man hat mir vorgeworfen, ich übertrage die Arbeitsweise der Physiker auf die Medizin. Nun gut, ich will mich gern schuldig bekennen. Denn heute liegt die Quelle des wissenschaftlichen Fortschritts mehr denn je an den Grenzen, in den Grauzonen zwischen den Spezialdisziplinen - und im Können und Mut jener Forscher, die sich dazwischen bewegen.

Manfred Baron von Ardenne

Die vorliegende Arbeit wurde am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI) in Reutlingen in der Arbeitsgruppe Regenerative Medizin II (Arbeitsgruppenleiterin: Karin Benz) durchgeführt.

Zusätzlich konnten während eines dreimonatigen Aufenthalts an der Universität in Pittsburgh, *School of Medicine*, im Institut der orthopädischen Chirurgie Erfahrungen in einem internationalen Laborumfeld gesammelt werden. Die praktische Arbeit wurde dort am *Center for Cellular and Molecular Engineering* unter der Leitung von Rocky S. Tuan durchgeführt (hier als Labor Tuan bezeichnet).

Während der Entstehung der hier vorliegenden Forschungsarbeit hatte ich vielfältige interessierte, hilfreiche und kollegiale Unterstützung für die ich mich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Karin Benz. Sie gab mir die Möglichkeit mich mit einem sehr interessanten Themengebiet auseinanderzusetzen, welches sich (vor allem) zwischen der Biologie und der Medizin bewegt und worin, meiner Meinung nach, auch in der Zukunft ein großes Forschungs- und Anwendungsinteresse bestehen wird. Weiter gilt mein Dank Dr. Jürgen Mollenhauer, welcher sowohl in beratender Funktion am NMI sowie als Forschungsleiter der TETEC AG (Reutlingen) tätig ist. Beide standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Dankbar bin ich für die wertvollen Tipps und die vielen Gespräche, die ich mit den beiden erleben durfte.

Für die Begutachtung der Arbeit möchte ich Prof. Dr. Burkhard Schlosshauer (NMI) und Prof. Dr. Konrad Kohler (ZRM Universität Tübingen) herzlichst danken.

Der Arbeitsgruppe Regenerative Medizin II (Claudia Stippich, Christian Freudigmann, Barbara Platz) und den Mitarbeitern der Forschungsgruppe der TETEC AG (Claudia Osswald, Barbara Beintner) möchte ich für das gute und kooperative Arbeitsklima danken. Bedanken möchte ich mich auch noch einmal insbesondere bei Claudia Osswald für die gewissenhafte Ausführung der Experimente im Zuge ihrer Bachelorarbeit, welche in Teilen zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beitragen konnten. Auch möchte ich mich bei der Unterstützung der Kollegen unter anderem bei der Aufarbeitung des Knochenmarks bedanken.

Der GELITA AG (Eberbach), hier insbesondere Herrn Dr. Michael Ahlers, möchte ich für die Bereitstellung der Gelatinegel-Rohmaterialien und für das entgegengebrachte Interesse für meine Arbeit danken. Den Ärzten der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen (insbesondere Dr. Bernd Schewe) und deren Patienten möchte ich ebenso für die Bereitstellung des humanen Knochenmarks danken.

Allen Kollegen des NMIs möchte ich für die Harmonie und die angenehme Atmosphäre, die ich in den letzten Jahren erleben durfte, danken. Durch die Verknüpfung der Arbeitsgruppen untereinander war es mir möglich, auch arbeitsgruppenübergreifend Einblicke in die Forschungsarbeiten anderer Kollegen zu gewinnen. Das bedeutete auch in der eigenen Arbeit einen Mehrgewinn. Dafür vielen Dank an Jennifer Metzger, Sabine Trinks, Björn Traenkle, Beate Scholz, Reiner Hajosch und alle anderen.

Prof. Dr. Rocky S. Tuan möchte ich besonders für die unkomplizierte und schnelle Aufnahme in sein Labor und für die inspirierenden Gespräche danken, Beverly Knasko und Timothy McCann für die Geduld bei der Überwindung bürokratischer Hürden und für die administrative Hilfe. Dem ganzen Laborteam in Pittsburgh großen Dank für die schnelle und freundliche Integration. Boehringer Ingelheim Fonds möchte ich für das Reisestipendium danken, welches mir den Aufenthalt in Pittsburgh erst ermöglichte.

INHALT

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
1 EINLEITUNG	- 2 -
1.1 Stamm- und Vorläuferzellen des menschlichen Körpers	- 2 -
1.2 Mesenchymale stromale Vorläuferzellen (MSCs)	- 3 -
1.3 Das chondrogene Differenzierungspotential von MSCs	- 7 -
1.4 Anwendung von MSCs des Knochenmarks bei der Regeneration der degenerierten Bandscheibe	- 8 -
1.5 Aus dem Labor in die Klinik	- 11 -
1.6 Zielsetzung der Arbeit	- 13 -
2 MATERIAL	- 14 -
2.1 Geräte	- 14 -
2.2 Verbrauchsmaterialien	- 15 -
2.3 Chemikalien und Enzyme	- 15 -
2.4 Fertigsets (<i>kits</i>)	- 16 -
2.5 Spenderproben	- 16 -
2.6 Zellkulturmedien	- 17 -
2.6.1 Einfriermedium	- 17 -
2.6.2 MSC-Expansionsmedium	- 17 -
2.6.3 Chondrogenes Differenzierungsmedium	- 18 -
2.7 Gelatinegele	- 18 -
2.7.1 Gelatine-Gellösung	- 18 -
2.7.2 Gelatine-HA-Gellösung	- 19 -
2.8 Lösungen und Puffer	- 19 -
2.8.1 Lösungen für die Alcianblaufärbung	- 19 -
2.8.2 Lösungen für die sGAG-Bestimmung	- 20 -
3 METHODEN	- 21 -
3.1 Isolierung mesenchymaler Vorläuferzellen (MSCs) aus dem Knochenmark	- 21 -
3.2 Expansion und Lagerung von MSCs	- 22 -
3.3 Herstellung hochdichter Mikromassekulturen	- 22 -
3.4 Herstellung zelleingebetteter Gelatine- und Gelatine-Hyaluronan (HA)-Gele	- 23 -
3.5 Bestimmung der Hydrogelstabilität im Kultivierungsverlauf	- 23 -

3.6	Größenmessung von Mikromassen	- 24 -
3.7	Lebend- und Totzellzahlbestimmung in Hydrogelen	- 24 -
3.7.1	Calcein-Färbung	- 25 -
3.7.2	Propidiumiodid-Färbung	- 25 -
3.7.3	Präparatvorbereitung	- 25 -
3.7.4	z-Stapelaufnahmen am <i>ApoTome</i>	- 26 -
3.8	Relative Quantifizierung der Markergenexpression	- 28 -
3.8.1	Herstellung von Zelllysaten	- 28 -
3.8.2	Isolierung von RNA	- 29 -
3.8.3	Reverse Transkription (RT)	- 29 -
3.8.4	RT- <i>realtime</i> -Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)	- 30 -
3.9	Histologische Färbungen	- 37 -
3.9.1	Anfertigen von Gefrierschnitten	- 37 -
3.9.2	Selektive Alcianblaufärbung	- 38 -
3.9.3	Immunhistologische Färbungen	- 38 -
3.10	Quantifizierung sulfatierter Glykosaminoglykane (sGAG)	- 39 -
3.11	Statistische Analyse	- 40 -
4	<u>ERGEBNISSE</u>	- 41 -
4.1	Einfluss von MSC-Isolierungs- und Expansionsprotokollen auf die chondrogene Differenzierung	- 41 -
4.2	Gelatinehydrogele als Zellträger	- 44 -
4.3	Chondrogene Differenzierung in Gelatine-basierten Hydrogelen	- 48 -
4.4	Verbesserung der chondrogenen Differenzierung durch die Reduktion des Sauerstoffs	- 53 -
4.5	Anpassung der Differenzierungsprotokolle für Anwendungen von MSCs in der Klinik	- 59 -
4.5.1	Chondrogene Differenzierung ohne Dexamethason	- 59 -
4.5.2	Chondrogene Differenzierung ohne TGF- β 3	- 62 -
5	<u>DISKUSSION</u>	- 67 -
5.1	Die Qualität der Chondrogenese wird bereits durch die MSC-Isolierung und -Expansion beeinflusst	- 67 -
5.2	Gelatine-basierte Hydrogele sind für eine chondrogene Differenzierung von MSCs geeignet	- 69 -
5.3	Hypoxie bereits während der MSC-Expansion verbessert die Chondrogenese	- 73 -
5.4	Die Differenzierungsprotokolle konnten für die klinische Anwendung optimiert werden	- 75 -
6	<u>REFERENZEN</u>	- 78 -
	<u>VERÖFFENTLICHUNGEN</u>	- 97 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	mikro
%	Prozent
a	<i>antisense</i>
Abs.	Absorption
ACAN	Aggrekan
ACTB	Beta-Aktin
ALPL	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse; <i>analysis of variance</i>
BP	Bandpassfilter
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Calcein-AM	Calcein-bis-acetoxymethylester
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL1A2	Kollagen Typ I Alpha 2
COL2A1	Kollagen Typ II Alpha 1
COL10A1	Kollagen Typ X Alpha 1
3D	dreidimensional
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP/dUTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat/Desoxyribouridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Em.	Emission
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FKS	Fötale bovines Serum
FT	Strahlteiler (<i>fluorescence threshold</i>)
g	Gramm
x g	x-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GC	Guanin/Cytosin
Gly	Glycin
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
h	Stunde

HA	Hyaluronan
HAS2/3	Hyaluronansynthase 2/3
HPRT I	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase I
l	Liter
m	<i>messenger</i>
m	Meter
m	milli
M	molar (mol/l)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIA	<i>melanoma inhibitory activity</i>
min	Minute
MSC	mesenchymale stromale Vorläuferzelle (<i>mesenchymal stromal precursor cell</i>)
N	Anzahl
n	nano
n.b.	nicht bestimmt
NMI	Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen
α-MEM	<i>Minimum Essential Medium α</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
s	<i>sense</i>
Sox-9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Triton	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol
T _s	Schmelztemperatur
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
UBC	Ubiquitin C
vs.	<i>versus</i> ; gegen[über]
YWHAZ	<i>Tyrosin 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide</i>
z. B.	zum Beispiel

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1: Oberflächenmolekülanalyse von kultivierten MSCs des Knochenmarks.....	5 -
Abbildung 2: Ablagerung von Kollagen Typ II und Aggrecan in Hydrogelen nach der chondrogenen Differenzierung unfraktionierter bzw. vorsortierter MSCs	6 -
Abbildung 3: Aufbau einer gesunden Bandscheibe	8 -
Abbildung 4: Regenerative Therapieansätze zur Behandlung der degenerierten Bandscheibe	11 -
Abbildung 5: MSC-Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	21 -
Abbildung 6: Einstufung der Gelstabilität während der Kultivierung von MSCs in Hydrogelen	24 -
Abbildung 7: Bestimmung des Flächeninhalts einer Mikromasse.	24 -
Abbildung 8: Vorbereitung eines Objektträgers für Aufnahmen am <i>ApoTome</i>	26 -
Abbildung 9: <i>Zeiss</i> -Mikroskop mit <i>ApoTome</i> -Modul	27 -
Abbildung 10: Aufnahme von Calcein-gefärbten MSCs in einem Gelatinegel mit konventioneller Fluoreszenz (A) und im <i>ApoTome</i> -Modus (B).	27 -
Abbildung 11: Schmelzkurve mit Primerdimer- und Produktbildung.....	33 -
Abbildung 12: Bestimmung der PCR-Effizienz	35 -
Abbildung 13: Einfluss von MSC-Isolierung und -Expansion auf die Morphologie und die Synthese von Chondrozytenmarkern.....	44 -
Abbildung 14: Größe und Zelldichte von Mikromasse- und Hydrogelkulturen.....	45 -
Abbildung 15: Viabilität von MSCs in Gelatine-HA-Hydrogelen.....	47 -
Abbildung 16: Stabilität der Gelatine-HA-Gele während der Kultivierung von MSCs.....	48 -
Abbildung 17: mRNA-Expression von MSCs, Chondrozyten des hyalinen Knorpels und Bandscheibenzellen	52 -
Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von Gelatinegelen mit eingebetteten MSCs	53 -
Abbildung 19: Flächeninhalt der Querschnitte von Mikromassen nach der Kultivierung der MSCs unter Hypoxie (4 % O ₂) bzw. Normoxie (20 % O ₂).....	54 -

Abbildung 20: Effekt der Hypoxie auf die mRNA-Expression von Chondrozytenmarkern in differenzierten MSCs.....	- 57 -
Abbildung 21: Ablagerung von Extrazellulärmatrix in Mikromassen und in Gelatinegelen nach der Differenzierung von MSCs für acht Wochen.....	- 58 -
Abbildung 22: Chondrogene Differenzierung von MSCs in Gelatine-basierten Hydrogelen mit und ohne Zusatz von Dexamethason	- 61 -
Abbildung 23: sGAG-Gehalt in Gelatinehydrogelen nach der Kultivierung von MSCs mit Standarddifferenzierungsmedium mit und ohne Dexamethason.....	- 61 -
Abbildung 24: Effekt der Kultivierung ohne TGF- β 3 auf die chondrogene Differenzierung von MSCs.....	- 63 -
Abbildung 25: Effekt der Reduktion (A) und des Entfernens (B) von TGF- β 3 nachdem die Differenzierung mit Standarddifferenzierungsmedium induziert wurde.	- 66 -
Tabelle 1: Primer für die RT-qPCR	- 31 -
Tabelle 2: PCR-Effizienzen und Schwellenwerte.....	- 35 -
Tabelle 3: Referenzgenbestimmung durch <i>geNorm</i> bei verschiedenen Kulturbedingungen-	36 -
Tabelle 4: Erstantikörper für immunhistologische Färbungen.....	- 38 -
Tabelle 5: mediane mRNA-Expressionslevel.....	- 49 -

ZUSAMMENFASSUNG

Vorläuferzellen, welche aus adultem Gewebe isoliert werden können, haben das Potential, in verschiedene Gewebezellen zu differenzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung zu einem chondrozytären Phänotyp untersucht, wobei hierfür humane mesenchymale stromale Vorläuferzellen (MSCs) des Knochenmarks verwendet wurden. Als Zellträger wurden Gelatinegele ausgewählt, und deren Eignung als Differenzierungsmatrix getestet und bestätigt. MSCs wurden dafür *in vitro* in geringer Zelldichte in diese Hydrogele eingebettet und chondrogen differenziert. Über mehrere Wochen hinweg konnten vitale Zellen detektiert werden. Die Synthese von Extrazellulärmatrix und die Expression von Genen, welche ebenso in Bandscheibenzellen und in Chondrozyten des hyalinen Knorpels exprimiert werden, bestätigten die erfolgreiche Chondrogenese der Zellen in den Gelen. Auffallend war, dass bereits die Isolierungs- und Expansionsbedingungen für undifferenzierte MSCs einen Einfluss auf die Qualität der Differenzierung nahmen. Auch konnte eine Verbesserung der Chondrogenese erreicht werden, wenn MSCs bei 4 % Sauerstoff kultiviert wurden. So zeigten hypoxisch expandierte MSCs bei anschließender Differenzierung verstärkte Ablagerungen sulfatierter Glykosaminoglykane im Vergleich zu den normoxisch expandierten.

Die Fähigkeit der MSCs, eine knorpelspezifische Matrix aufzubauen, eröffnet die Möglichkeit für regenerative Therapien von Knorpelgewebe, wie z. B. der degenerierten Bandscheibe. Hinsichtlich der Anwendung in der Regenerationsmedizin muss beachtet werden, dass die im Labor entwickelten Protokolle nicht unmittelbar klinisch eingesetzt werden können. Um die Differenzierungsprotokolle für klinische Anwendungen zu optimieren, wurde aus diesem Grund in der vorliegenden Arbeit die Notwendigkeit von Dexamethason bei der Differenzierung überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Chondrozytenmarkern und die Ablagerung sulfatierter Glykosaminoglykane ohne Dexamethasonzusatz erhöht wurden, so dass während der Differenzierung auf das Glukokortikoid verzichtet werden kann. Neben Dexamethason wurde auch untersucht, ob der Zusatz von TGF- β 3 als Induktor der chondrogenen Differenzierung notwendig ist. Ohne den Zusatz des Zytokins fand keine Differenzierung statt. Es war jedoch möglich den chondrozytären Phänotyp aufrechtzuerhalten, wenn nach zweiwöchiger Differenzierungsphase auf TGF- β 3 verzichtet wurde. Die Expression chondrogener Marker konnte ebenfalls aufrechterhalten werden, wenn die Konzentration des Zytokins kontinuierlich im Verlauf der Differenzierung verringert wurde. Insgesamt ist eine Kombination aus Gelatinehydrogelen und humanen MSCs des Knochenmarks für chondrogene Differenzierungen geeignet, wobei durch Veränderungen der Kultivierungsbedingungen während der Expansions- und Differenzierungsphasen die Differenzierung verbessert werden konnte. Die Differenzierungsprotokolle konnten zusätzlich für Anwendungen in der Medizin angepasst werden.

1 EINLEITUNG

1.1 Stamm- und Vorläuferzellen des menschlichen Körpers

Im Verlauf der Entwicklung eines menschlichen Individuums können Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential vorgefunden werden. Die Entwicklung beginnt nach der Befruchtung der Eizelle, aus welcher sich durch Furchungsteilungen genetisch identische Zellen entwickeln. Diese Zellen sind totipotent, da jede einzelne Zelle in der Lage ist, durch Differenzierungen ein komplettes Individuum zu bilden [1]. Am 4. bis 5. Tag nach der Befruchtung entwickelt sich die Blastozyste, welche aus einer äußeren Zellschicht und einer inneren Zellmasse, dem so genannten Embryoblasten, aufgebaut ist. Der Embryoblast bildet die Anlagen für den Embryo [2]. Dessen Zellen sind pluripotent. Dies bedeutet, dass sie das Potential besitzen, zu jedem beliebigen Zelltyp der drei embryonalen Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) und zu Zellen der Keimbahn zu differenzieren, jedoch nicht mehr eigenständig einen vollständigen Organismus entwickeln können [3]. Die in dem Embryoblasten vorhandenen Zellen können aus der Blastozyste isoliert und *in vitro* kultiviert werden [4]. Die so gewonnenen embryonalen Stammzellen können in Kultur quasi unbegrenzt identische Tochterzellen bilden [5, 6]. Die Verwendung humaner embryonaler Stammzellen in der Forschung und der Medizin ist aufgrund der unumgänglichen Zerstörung humaner Embryonen ethisch umstritten. Neben der ethischen Bedenklichkeit ist aber auch das Risikopotential, welches von embryonalen Stammzellen ausgeht, sehr groß. So können diese z. B. bei einer Transplantation ins Gewebe Tumoren ausbilden, was in Tierversuchen gezeigt werden konnte [7-10]. In Deutschland wird die Verwendung embryonaler Stammzellen durch das Stammzellgesetz [11] und das Embryonenschutzgesetz [12] geregelt. Daraus hervorgehend ist die Entnahme und klinische Anwendung humaner embryonaler Stammzellen in Deutschland zurzeit verboten.

Im menschlichen Körper erlauben aber nicht nur embryonale Stammzellen eine Erforschung der Zelldifferenzierung, auch im postembryonalen Körper sind noch Stammzellen, bzw. so genannte Progenitor- oder Vorläuferzellen, vorhanden, welche zu verschiedenen Zelltypen differenzieren können. Diese sind physiologisch unter anderem am Gewebewachstum und an der Gewebemöostase beteiligt und reparieren gegebenenfalls geschädigtes Gewebe, wie z. B. die Zahnschmelze, das Hautepithel oder Blutgefäße [13-16]. Hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks z.B. sind für die ständige Erneuerung der Blutzellen zuständig und damit von enormer physiologischer Bedeutung [17, 18]. Dies wird vor allem deutlich, wenn genetische Entartungen dieser Zellen auftreten, da dies zu Krebserkrankungen des blutbildenden Systems, so genannten Leukämien, führen kann [19-21]. Auch wird in

manchen soliden Tumoren das Vorhandensein so genannter Krebsstammzellen diskutiert [22-27].

Seit mehreren Jahrzehnten werden hämatopoetische Vorläuferzellen bei der Behandlung von Leukämien, Lymphomen, Anämien und Immundefekten verwendet [28-34]. Nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen sind zurzeit in der Klinik weniger etabliert. So hat seit 2007 die *Euroderm GmbH* (Leipzig) eine Herstellungserlaubnis für das epidermale Äquivalent *EpiDex*, welches aus patienteneigenen Zellen der äußeren Haarwurzelscheide von Haarfollikeln gezüchtet wird und zur Therapie chronischer Wunden eingesetzt werden kann. Der Vorteil von adulten Vorläuferzellen, im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, ist, dass man zelleigene (autologe) adulte Vorläuferzellen im Menschen anwenden kann, wodurch keine Immunreaktion zu erwarten ist. Weiterhin konnte bisher keine Tumorbildung aufgrund angewendeter adulter Vorläuferzellen festgestellt werden. Die Suche von klinischen Studien in internationalen Metadatenbanken (<http://clinicaltrials.gov>; <http://www.controlled-trials.com/mrct/>) zeigt ein großes Interesse an der klinischen Anwendung von Vorläuferzellen. So werden derzeit adulte, auch nicht-hämatopoetische Vorläuferzellen für die Behandlung vieler verschiedener Krankheitsbilder getestet. So sollen diese Zellen unter anderen bei der Behandlung von Diabetes Mellitus, von Herzkrankheiten, Krebs, Atemwegserkrankungen und von Knorpeldefekten verwendet werden (Identifikationsnummern: NCT00893360, NCT01219465, NCT00384982, NCT00998361, NCT00539500, NCT00683722, NCT01227694, NCT01290367, NCT00690066, ISRCTN68837678, CDR0000065391).

Adulte Vorläuferzellen ließen sich bisher in über 20 Geweben, unter anderem im Knochenmark, in der Haut, im Fettgewebe, im Herz, im artikulären Knorpel und in der Leber, finden [35-42]. Sie sind in jedem Individuum verfügbar und durch ihre Fähigkeit in bestimmte Gewebezellen zu differenzieren eine beliebte Zellquelle für die Forschung. Die meist erforschten adulten Vorläuferzellen sind die des Knochenmarks. Aus diesem können drei unterschiedliche Vorläuferzelltypen isoliert werden: die hämatopoetischen, die epithelialen und die mesenchymalen stromalen Vorläuferzellen (MSCs) [43]. Da in der vorliegenden Arbeit für Differenzierungsuntersuchungen MSCs des Knochenmarks herangezogen wurden, soll auf diese Vorläuferzellen in den nächsten Abschnitten näher eingegangen werden.

1.2 Mesenchymale stromale Vorläuferzellen (MSCs)

MSCs können aus verschiedenen Geweben, wie z. B. dem Knochenmark, dem Fettgewebe, der Zahnschmelze, der Synovialflüssigkeit und aus artikulärem Knorpel isoliert werden [38, 44-47]. Die internationale Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) definiert diese Vorläuferzellen als Zellen, welche eine Plastikadhärenz aufweisen, ein multipotentes Differenzierungspotential

besitzen und spezifische Oberflächenmarker exprimieren. Demnach sollen alle MSCs CD73, CD90 und CD105 auf ihrer Oberfläche zeigen, während praktisch kein CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR zu finden sein darf [48]. Ob adulte Vorläuferzellen, zumindest teilweise, wie embryonale Stammzellen pluripotent oder ob sie nur multipotent sind, lässt sich nach derzeitiger Forschungslage nicht endgültig klären. So beschreiben einige Autoren, dass die Vorläuferzellen bereits soweit spezialisiert sind, dass ihnen nur die Differenzierung innerhalb der Entwicklungsrichtung eines Keimblattes möglich ist [49]. Differenzierungen innerhalb des mesodermalen Keimblattes, was z. B. einer chondrogenen, osteogenen und adipogenen Differenzierung entspricht, wurden bei MSCs vielfach durchgeführt [50-53]. In den letzten Jahren konnte aber vermehrt gezeigt werden, dass MSCs auch Keimblatt-übergreifend differenzieren können. So konnten z. B. MSCs des Knochenmarks neurogen differenziert werden, was einer Transdifferenzierung zu Gewebe ektodermalen Ursprungs bedeutet [54, 55]. In der Literatur wurden auch weitere Transdifferenzierungen von MSCs zu Gewebetypen sowohl ekto- als auch entodermalen Ursprungs beschrieben [56]. So können MSCs z. B. auch zu kardiogenen, pankreatischen und hepatischen Zellen differenziert werden [57-59]. Nie und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass MSCs des Fettgewebes die Wundheilung von Haut verbessern können, indem die Zellen sowohl in endotheliale als auch in epitheliale Zellen differenzieren [60].

Je nach Gewebeer sprung haben MSCs unterschiedliche Differenzierungspräferenzen, obwohl alle Zellen die gleichen oben genannten Oberflächenmarker zeigen. So haben MSCs dentalen Ursprungs z. B. die Präferenz, zu einem osteogenen und neuronalen Phänotyp zu differenzieren [61, 62]. Das legt den Schluss nahe, dass in verschiedenen Geweben einzelne MSC-Subpopulationen prozentual unterschiedlich auftreten. Die in den Gewebetypen vorherrschenden Nischenbedingungen führen womöglich zu einer Vordifferenzierung einzelner oder aller Subpopulationen oder regulieren die Anzahl einzelner Subpopulationen. Dass MSCs nicht homogen sind, sondern aus Subpopulationen bestehen, wird deutlich, wenn man sich die Oberflächenantigene der Gesamtpopulation anschaut. So gibt es Antigene, welche unterschiedlich auf den Zellen exprimiert werden [63-65]. Auch während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde in Voruntersuchungen die Expression von Oberflächenmolekülen durchflusszytometrisch untersucht, und das Auftreten einzelner Subpopulationen bestätigt, wie aus Abbildung 1 hervorgeht.

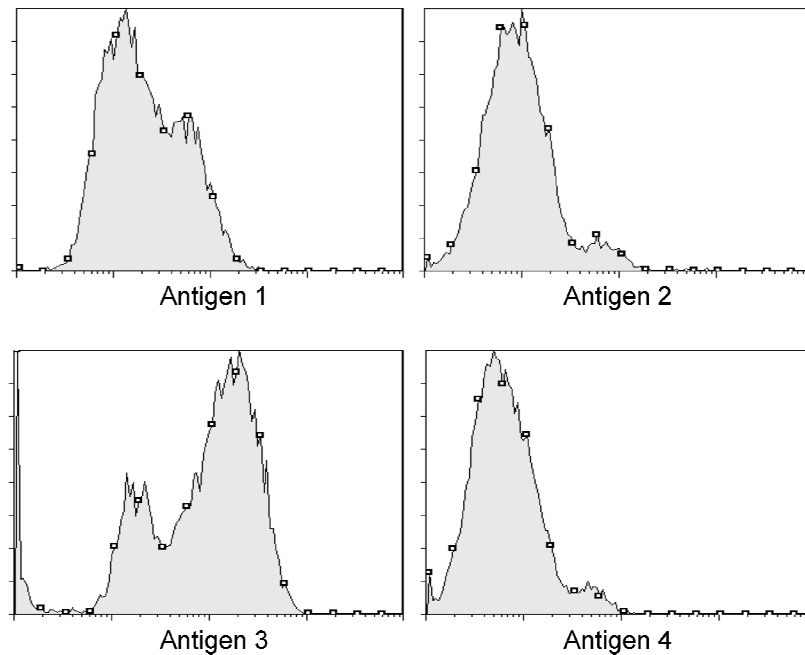


Abbildung 1: Oberflächenmolekülanalyse von kultivierten MSCs des Knochenmarks. Es ist zu erkennen, dass MSCs keine einheitliche Zellpopulation darstellen, sondern aus Subpopulationen mit unterschiedlich stark exprimierten Oberflächenantigenen bestehen.

Unterschiede im Oberflächenprofil sind auch auffindbar, wenn man frisch isolierte und kultivierte MSCs miteinander vergleicht. So beschreiben Battula und Kollegen einen Verlust des Moleküls CD56 in Kultur, wenn MSCs aus dem Knochenmark isoliert werden, welche positiv für CD271 und CD56 sind [66]. Des Weiteren beschreiben die Autoren ein chondrogenes Potential für CD56-positive Zellen, während chondrogen differenzierte CD56-negative Pelletkulturen wesentlich kleiner waren und hauptsächlich apoptotische Zellen enthielten. Eine adipogene Differenzierung hingegen konnte allein in CD56-negativen MSC-Subpopulationen erzielt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht alle MSC-Subpopulationen des Knochenmarks das gleiche Differenzierungspotential besitzen. Es ist deshalb denkbar, für gezielte Differenzierungen, einzelne Subpopulationen zu isolieren und für die Differenzierung zu verwenden. So könnten für eine chondrogene Differenzierung z. B. die nicht-chondrogenen CD56-negativen Zellen bei der Kultivierung ausgeschlossen werden. Die CD56-positiven Zellen haben aber neben dem chondrogenen Potential auch prinzipiell das Potential zur z. B. osteogenen, myogenen und neuronalen Differenzierung [66], auch ist nur ein verschwindend geringer Teil der MSCs positiv für CD56 [63]. Wenn die quantitativ überlegenen CD56-negativen MSCs nicht chondrogen induzierbar wären, würden unfraktionierte MSCs nur ein sehr geringes chondrogenes Potential zeigen. Da eigene Voruntersuchungen aber zeigen, dass dieses sehr ähnlich dem der CD56-positiven, chondrogenen Zellen ist (Abbildung 2), müssen die CD56-positiven Zellen andere Subpopulationen beeinflussen und zur chondrogenen Differenzierung bringen können.

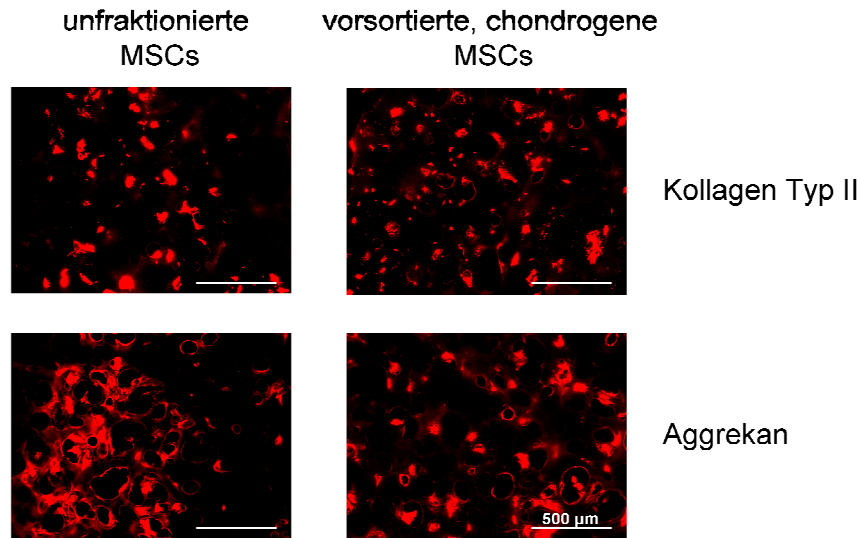


Abbildung 2: Ablagerung von Kollagen Typ II und Aggrecan in Hydrogelen nach der chondrogenen Differenzierung unfraktionierter bzw. vorsortierter MSCs. Auch ohne Vorsortierung wird ähnlich viel Extrazellulärmatrix synthetisiert wie nach der Vorsortierung chondrogener MSCs.

Aus diesen Gründen ist eine Vorsortierung einzelner MSC-Subpopulationen allein fraglich, um einen bestimmten Differenzierungsphänotyp zu erhalten. Es ist demnach erfolgversprechender, wenn für *in vitro*-Differenzierungen die äußeren Bedingungen so angepasst werden, dass eine optimale Nische für eine Differenzierung erhalten wird. Durch eine Optimierung der Milieubedingungen könnte das natürliche Potential der MSCs ausgenutzt werden, eine bestimmte Differenzierungsrichtung einzuschlagen. Dass die richtigen Nischenbedingungen eine gezielte Differenzierung zu einem bestimmten Phänotyp auslösen können, wurde bereits von mehreren Autoren publiziert. Schon im Jahr 1978 zeigten Nathanson und Kollegen, dass Knorpelgewebe aufgebaut wird, wenn die aus Hühnerembryonen gewonnene Zellen des Skelettmuskels, der Schilddrüse- und der Lunge in einer entsprechenden Umgebung, in diesem Fall auf einer Knochenmatrix, kultiviert werden [67]. Auch werden Vorläuferzellen des Hippocampus bzw. des Vorderhirns z. B. im olfaktorischen System gezielt zu olfaktorischen Neuronen differenziert [68, 69]. In der Klinik wird das natürliche Differenzierungspotential z. B. bei der Regeneration von Knorpeldefekten ausgenutzt. Während eines chirurgischen Eingriffes werden MSCs durch eine Mikrofrakturierung des unter der Defektstelle liegenden Knochens aus dem Knochenmark befreit und wandern in die Defektstelle ein [70, 71]. Dort wird ein Faserknorpel gebildet, welcher die Defektstelle ausfüllt. Auch diese Beobachtung unterstreicht, dass durch äußere Bedingungen die Differenzierungsrichtung von MSCs beeinflusst wird. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die *in vitro* Milieubedingungen so zu verändern, dass

nach der chondrogenen Differenzierung der heterogenen MSCs des Knochenmarks ein qualitativ hochwertiger chondrozytärer Phänotyp entsteht.

1.3 Das chondrogene Differenzierungspotential von MSCs

Im Jahr 1995 veröffentlichten Noble und Kollegen, dass Stromazellen des porcinen Knochenmarks *in vitro* nach der Kultivierung mit D-MEM, FBS und Dextransulfat Aggregate bildeten, welche die Kollagen Typen I und II ablagerten [72]. Auch Denker und Kollegen zeigten im gleichen Jahr, dass eine multipotente Mauszelllinie, nach der Kultivierung mit TGF- β 1 in einer hochdichten Mikromassekultur, Extrazellulärmatrix mit knorpelähnlicher Histologie bildete [73]. Johnstone und Kollegen beschrieben daraufhin 1998 erstmals, dass MSCs vom Knochenmark des Kaninchens in der Lage waren chondrogen zu differenzieren, wenn diese in dicht gepackter Pelletform mit einem definiertem Medium kultiviert wurden [74]. Die Autoren induzierten die Differenzierung mit Dexamethason und TGF- β 1 und sahen die Bildung einer kondensierten Struktur als Voraussetzung für die Differenzierung an. Seither wird die chondrogene Differenzierung von MSCs in Mikromasse- bzw. Pelletform, wie von Johnstone und Kollegen vorgeschlagen, weit verbreitet verwendet. Die Autoren konnten zeigen, dass die Pelletkulturen eine Extrazellulärmatrix bilden, welche der des Knorpels ähnelt. Im Körper ist die Extrazellulärmatrix je nach Funktion des Knorpels unterschiedlich zusammengesetzt. Der hyaline Gelenkknorpel z. B. besitzt durch den hohen Anteil an Aggrekan und Kollagen Typ II, welches 80 bis 90 % aller Kollagene ausmacht, eine hohe Druckelastizität [75, 76]. Die gesunde Bandscheibe wiederum besteht aus verschiedenen Knorpeltypen (Abbildung 3). So befindet sich in der Mitte der Bandscheibe ein gelartiger Kern, der Nucleus pulposus, welcher von einem äußeren Faserring, dem Anulus fibrosus, umgeben ist [77]. Der Nucleus pulposus, welcher entwicklungsgeschichtlich von der Chorda dorsalis abstammt, also ektodermalen Ursprungs ist [76], ist reich an Kollagen Typ II und Aggrekan und hat aufgrund des hohen Glykosaminoglykangehaltes einen hohen Wassergehalt [78]. Somit ist er in der Lage, Druck von außen, der durch mechanische Belastung entsteht, standzuhalten. Der vom Mesoderm abstammende Anulus fibrosus besteht hauptsächlich aus unidirektionalen Kollagenfasern (hauptsächlich des Typs I), welche ringförmig um den Nucleus pulposus verlaufen [78, 79]. Durch die hohe Zugfestigkeit wirkt der Faserring als Stütze des Nucleus pulposus.

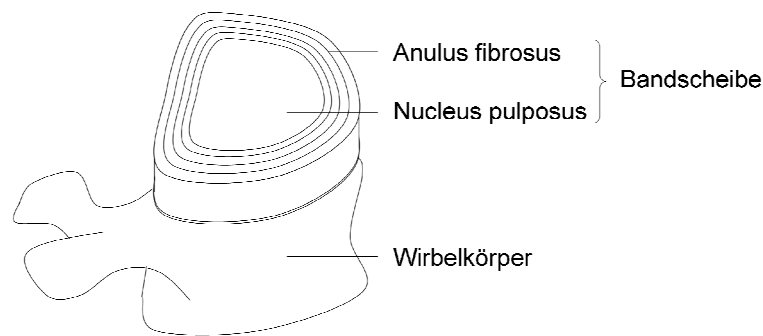


Abbildung 3: Aufbau einer gesunden Bandscheibe.

Chondrogen differenzierte MSCs exprimieren Gene, welche sowohl im hyalinen Knorpel als auch im Bandscheibenknorpel von funktioneller Bedeutung sind. So exprimieren sie z. B. Aggrekan, das Hauptproteoglykan der Extrazellulärmatrix [80, 81], und Kollagen Typ II, das Hauptkollagen des hyalinen Knorpels und des Nucleus pulposus [78]. Auch werden die Hyaluronansynthasen 1, 2 und 3, welche die Hyaluronsäure der Extrazellulärmatrix synthetisieren [82-84], MIA (*melanoma inhibiting activity*), welches wahrscheinlich den chondrozytären Phänotyps stabilisiert [85] und Sox-9, ein Transkriptionsfaktor, welcher die Extrazellulärmatrixgenexpression reguliert [86, 87], exprimiert. Kollagen Typ I, welches vorrangig in Bindegewebszellen und im Anulus fibrosus der Bandscheibe als Stützkollagen auftritt [78, 79], und Kollagen Typ X, welches als Marker für hypertrophe Chondrozyten verstanden wird und im alternden Nucleus pulposus zu finden ist [88], lassen sich ebenso in der Extrazellulärmatrix finden. Auch wird von den Zellen Alkalische Phosphatase, ein Marker für die beginnende Mineralisierung [89, 90], exprimiert.

Bei der Untersuchung des Genexpressionsprofils differenzierter MSCs und dessen Vergleich mit den Expressionsprofilen von Gelenkknorpel- und Bandscheibenzellen kamen Steck und Kollegen zu dem Schluss, dass die Genexpression chondrogen differenzierter MSCs sehr ähnlich der der Bandscheibenzellen ist [91]. Diese Erkenntnis eröffnet die Möglichkeit der Anwendung von MSCs bei der Regeneration von Bandscheibengewebe.

1.4 Anwendung von MSCs des Knochenmarks bei der Regeneration der degenerierten Bandscheibe

Für eine Wiederherstellung von hyalinem Gelenkknorpel werden in der Klinik unter anderem autologe Chondrozyten verwendet [92, 93]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass in einem ersten operativen Eingriff gesunder Knorpel an einer weniger belasteten Stelle entnommen werden muss, um Chondrozyten daraus zu gewinnen [94]. Bei einem Bandscheibenvorfall, bei welchem Nucleus pulposus-Gewebe aus dem Anulus fibrosus hervortritt, können ebenfalls

Zellen zur Reimplantation gewonnen werden. Hier wird das vorgefallene Gewebe häufig operativ entfernt. Aus diesem können autologe Zellen isoliert, expandiert und dem Patienten reimplantiert werden [95, 96]. Anders sieht die Situation bei der Bandscheibendegeneration aus, welche unter anderem als Teil des Alterungsprozesses in der zweiten Lebensdekade des Menschen eintritt [97, 98]. Die adulte Bandscheibe ist avaskulär, wodurch es zu einer schlechten Versorgung mit Nährstoffen, vor allem im inneren Teil des Nucleus pulposus, kommt [97, 99]. Daraus folgend können ein erhöhtes Zellsterben, morphologische Änderungen in der Matrix sowie Risse im Nucleus pulposus festgestellt werden. Im weiteren Verlauf der Degeneration können hypertrophe Chondrozyten und Gewebe, welches dem Narbengewebe sehr ähnlich ist, vorgefunden werden. Häufig ist dann eine Unterscheidung der anatomischen Regionen nicht mehr möglich [97]. Bei der Degeneration der Bandscheibe kommt es zu einem Missverhältnis zwischen Matrixsynthese und -degradation und somit zu einem verstärkten Abbau von Extrazellulärmatrix. Dies führt im Nucleus pulposus zu einer verringerten Wasserbindekazapazität, weshalb dieser seine Funktion als „Stoßdämpfer“ nicht mehr erfüllen kann. Zusätzlich kommt es zu einer Einschränkung der Beweglichkeit des entsprechenden Wirbelsäulenabschnittes.

Bei aufgetretener Degeneration können keine Bandscheibenzellen aus dem sehr zellarmen Gewebe entnommen werden, weshalb man für eine Regeneration auf Alternativen angewiesen ist (Abbildung 4). Hierfür könnten z. B. die verbliebenen Zellen des Nucleus pulposus durch die Gabe von Zytokinen zur Proliferation bzw. zur Produktion von Matrixmolekülen angeregt werden. Im Kleintiermodell war die Verwendung von Zytokinen bisher recht vielversprechend [100-103], allerdings ist der langfristige Erfolg durch die geringe Halbwertszeit als auch durch Diffusionseffekte der Zytokine fragwürdig. Des Weiteren ist diese Anwendung nur im Anfangsstadium der Degeneration möglich, da bei fortgeschrittener Erkrankung die Zellzahl für eine Selbstregeneration zu gering ist.

Ein alternativer Therapieansatz ist die Implantation einer Hydrogelmatrix in die degenerierte Bandscheibe. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Bandscheibenzellen in *in vivo* injizierte Hydrogele hinein migrierten [93]. Auch dieser Therapieansatz setzt voraus, dass die Zellzahl hoch genug ist, um eine Regeneration erwirken zu können. Vermutlich ist die Transplantation von Hydrogelen eine Therapie, die zwar kurzfristig Besserung verspricht, der es aber an Nachhaltigkeit fehlt.

Ein anderer, regenerativer Ansatz ist die Implantation von Zellen, welche in der Lage sind, Extrazellulärmatrix zu synthetisieren und somit die Funktionalität der Bandscheibe wieder herzustellen. Aufgrund ihres chondrogenen Potentials sind MSCs des Knochenmarks solche Zellen. Sie können einfach, schnell und ohne größeren Eingriff aus dem Knochenmark des Patienten entnommen werden [104]. Im Gegensatz zu ausdifferenzierten Gewebezellen haben MSCs den Vorteil, dass sie, aufgrund gering exprimierter MHC I- und nicht exprimierter MHC II-Komplexe, immunprivilegiert sind [105]. Somit wäre neben der autologen auch eine allogene Transplantation von MSCs denkbar. Allo- bzw. autogene MSCs könnten direkt in

Suspension in die degenerierte Bandscheibe injiziert werden, allerdings ist es möglich, dass es so zu einer inhomogenen Zellverteilung im Gewebe [106] und durch eine fehlende Verankerung zu einer geringen Zellzahl an der Defektstelle kommt [107]. Eine Verankerung der Zellen in der Defektstelle ist möglich, wenn die Zellen in einer Trägermatrix injiziert werden, welche in das umgebende Gewebe integriert wird. Somit würden Zellen auch nach mechanischer Beanspruchung der Wirbelsäule nicht aus dem Bandscheibengewebe gedrückt werden.

Bei der Verwendung von MSCs für die Regeneration der Bandscheibe hat man die Möglichkeit, sowohl undifferenzierte als auch vordifferenzierte Zellen zu transplantieren. In welchem Differenzierungszustand MSCs später in der Klinik eingesetzt werden, ist noch offen. Le Maitre und Kollegen beschrieben in ihrer Publikation, dass MSCs älterer Menschen spontan zu Chondrozyten-ähnlichen Nucleus pulposus-Zellen differenzierten, wenn diese *in vitro* in den Nucleus pulposus des Rindes eingebettet wurden [108]. Demnach würden die Umgebungsbedingungen des Gewebes ausreichen, um eine Differenzierung zu induzieren. Dies müsste allerdings noch im Tiermodell *in vivo* bestätigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Ansatzmöglichkeiten, also sowohl die *in vitro*-Differenzierung, bei der vordifferenzierte Zellen injizierbar vorliegen müssen, als auch die Verwendung undifferenzierter MSCs, bei welcher die Trägermatrix eine chondrogene Differenzierung nicht unterdrücken darf, berücksichtigt. Als Differenzierungsmatrix bzw. als Zellträger wurden hier Gelatine-basierte Hydrogele verwendet und deren Anwendbarkeit für eine chondrogene Differenzierung von MSCs des Knochenmarks getestet. Gelatine besteht hauptsächlich aus denaturiertem Kollagen Typ I und ist aufgrund ihrer geringen Antigenität, ihrer Bioresorbierbarkeit und der leichten Modifizierbarkeit der physikochemischen Eigenschaften ein für klinische Anwendungen gut geeignetes Biomaterial [109-111]. Auch zeigt die langjährige Erfahrung bei der Verwendung von Gelatine in Medizinprodukten eine generelle gute Eignung des Materials für Anwendungen im Menschen. So wird Gelatine zur Verkapselung von Arzneimitteln (z. B. *Emesan-Zäpfchen, Lindopharm GmbH; Optovit select* Weichgelatine kapseln, *Hermes Arzneimittel GmbH*) aber auch für Hämostyptika (z. B. *GELITA-SPON, Gelitamedical BV; stypro, curasan AG; Gelatamp, Coltène/Whaledent GmbH & Co. KG; CHITOSKIN, Karl Beese GmbH & Co. KG*) verwendet. Dem Hydrogel wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit teilweise Hyaluronan (HA) zugesetzt. Hyaluronan ist ein langkettiges Glykosaminoglykan, welches physiologisch in der Extrazellulärmatrix vorhanden ist [112]. Dort sorgt es, aufgrund seiner negativen Ladung, für eine Bindung von Wasser im Gewebe. Hyaluronan wird schon seit vielen Jahren als Medizinprodukt verwendet (z. B. *Visiol* und *Ostenil, TRB Chemedica AG; Sinovial, IBSA Farmaceutici Italia Srl; Hylo-Vision, OmniVision GmbH; Xidan EDO, Dr. Gerhard Mann chemisch-pharmazeutische Fabrik GmbH*).

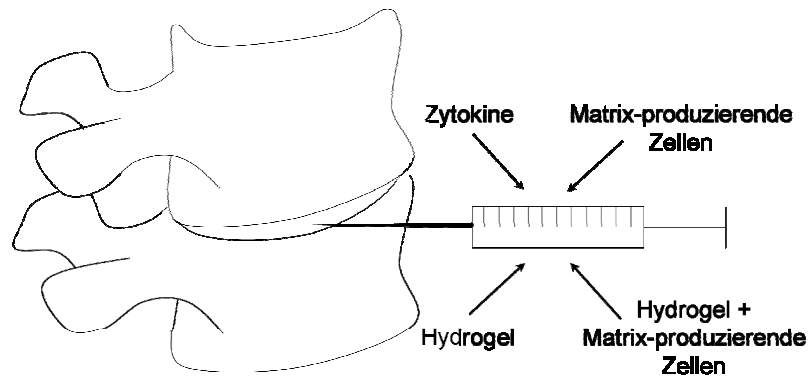


Abbildung 4: Regenerative Therapieansätze zur Behandlung der degenerierten Bandscheibe. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung einer Kombination aus Hydrogel und MSCs untersucht.

1.5 Aus dem Labor in die Klinik

Um eine Kombination aus MSCs und Hydrogel für eine Bandscheibenregeneration im Patienten verwenden zu können, müssen einige Zulassungsvoraussetzungen erfüllt werden. So müssen alle verwendeten Materialien nach *Good Manufacturing Practice* (GMP)-Richtlinien hergestellt und qualitativ charakterisiert sein. Zusätzlich muss die Unbedenklichkeit von Materialien, welche implantiert werden sollen, in nichtklinischen (*in vitro*- als auch in Tierversuchen) und klinischen Studien nachgewiesen werden. Ebenso muss die therapeutische Wirksamkeit bestätigt werden und der Therapienutzen muss die Risiken überwiegen [113]. Somit soll gewährleistet werden, dass die Gesundheitsrisiken für den Patienten minimal sind.

Die Herstellung GMP-konformer Substanzen bedeutet, im Vergleich zu nicht-GMP-konformen Substanzen, einen erheblichen finanziellen Mehraufwand. Da jede zur Fertigung eines Medizinproduktes verwendete Substanz unter GMP-Richtlinien hergestellt werden muss, auch wenn diese später nicht direkt dem Patienten verabreicht wird, sollten möglichst nur Substanzen verwendet werden, welche zum Erfolg einer Therapie notwendig sind. Auch sollten einem Patienten Substanzen nur dann direkt zugeführt werden, wenn es keine Möglichkeit gibt, dies zu vermeiden. Damit wird das Risiko unerwünschter Nebenreaktionen verringert. Zusätzlich muss die Unbedenklichkeit einer jeden Substanz, welche dem menschlichen Körper zugeführt wird, für eine klinische Zulassung nachgewiesen werden. Dies bedeutet einen sowohl zeitlichen als auch finanziellen Mehraufwand.

Typische Laborprotokolle werden in der Regel nicht unter klinischen Anwendungsaspekten entwickelt, da im Labor der Schwerpunkt eher auf der generellen Erforschung einer bestimmten Fragestellung liegt, wie z. B. ob es prinzipiell möglich ist, einen chondrozytären Phänotyp aus MSCs zu erhalten. Aus diesem Grund wird bei der Entwicklung von Protokollen selten auf eine Eignung der verwendeten Materialien für klinische Therapien geachtet. Für

eine Übertragung auf Anwendungen im Menschen müssen deshalb die im Labor entwickelten Protokolle so verändert werden, dass die Zulassungsvoraussetzungen erfüllt werden können. Im Verlauf dieser Arbeit sollten die Protokolle für eine chondrogene Differenzierung der MSCs so angepasst werden, dass die verwendeten Materialien später im Patienten eingesetzt werden könnten. Eine kritische, biologisch aktive Substanz ist hierbei Dexamethason, ein synthetisches Glukokortikoid, welches bereits seit vielen Jahren für verschiedenste Anwendungsgebiete pharmazeutisch zugelassen ist. Trotz der Zulassung als Arzneimittel, können viele unerwünschte Nebenwirkungen auf die Nutzung der Präparate zurückgeführt werden (z. B. *Dexa-CT* Ampullen, *CT-Arzneimittel GmbH*; *Dexamethason Sandoz parenteral* Injektionslösung, *Sandoz Pharmaceuticals GmbH*; *Fortecortin injekt* Ampullen, *Merck Pharma GmbH*; *Supertendin* Kristallsuspension, *UCB GmbH*; *Dexamethason Jenapharm* Tabletten, *Jenapharm GmbH & Co. KG*). So konnten bei oraler oder venöser Aufnahme unter anderem eine verzögerte Wundheilung, Osteoporose und Infektionen beobachtet werden. Wenn Dexamethason in das Gelenk injiziert wird, können teilweise Gelenkinfektionen, Reizungen, Unverträglichkeitsreaktionen, Hauterstörungen und Zerstörungen des Unterhautfettgewebes als Folge diagnostiziert werden. Um der potentiellen Gefahr von Nebenwirkungen aus dem Weg zu gehen, sollte Dexamethason aus diesem Grund nur zugeführt werden, wenn dieses für den Therapieerfolg notwendig ist.

Ebenso wie Dexamethason ist auch der *transforming growth factor* (TGF)- β ein biologisch aktiver Wirkstoff, welcher für eine chondrogene Differenzierung von MSCs in der Zellkultur verwendet wird. Das Zytokin wird bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht als pharmazeutisches Produkt angeboten. Deshalb kann nicht auf ein käufliches GMP-konformes Produkt zurückgegriffen werden. Somit sind für die Anwendung bei der Bandscheibenregeneration hohe Produktionskosten für eine GMP-konforme Herstellung zu erwarten. Derzeit gibt es lediglich ein TGF- β 3-Präparat, welches gerade in klinischen Studien getestet wird [114, 115]. Dieses Präparat (*Juvista, Renovo Group plc*) soll später, falls eine Zulassung erfolgt, in der Hautgeweberegeneration zur Verbesserung des Erscheinungsbildes von Narben verwendet werden. Da hier langfristige Erfahrungen bei der pharmazeutischen Verabreichung fehlen, sind die Nebenwirkungen der Substanz, vor allem bei der Regeneration von Knorpelgewebe, schlecht abzuschätzen. In der Literatur werden ungewollte Gewebeveränderungen beschrieben, welche durch TGF- β induziert werden können. So wird die Bildung knöcherner Strukturen, so genannter Osteophyten [52, 116-118], aber auch das Entstehen von Fibrosen (pathologische Bindegewebsvermehrungen) beschrieben [119-121].

Dexamethason und TGF- β , egal ob in pharmazeutischer Qualität bereits käuflich erwerblich oder nicht, erhöhen das Risiko unerwünschter Nebenreaktionen, wenn diese dem Körper des Patienten zugeführt werden. Zusätzlich ist für eine klinische Zulassung ein sowohl finanzieller als auch zeitlicher Mehraufwand zu erwarten. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob man auf den Zusatz dieser Substanzen verzichten kann, ohne die chondrogene Differenzierbarkeit der MSCs zu beeinträchtigen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, humane mesenchymale stromale Vorläuferzellen (MSCs) des Knochenmarks in Gelatine-basierten Hydrogelen chondrogen zu differenzieren. Da hierbei eine spätere Anwendung bei der klinischen Regeneration der Bandscheibe, einem Gewebe mit begrenzter Nährstoffversorgung, berücksichtigt werden sollte, sollte die Differenzierung bei geringer Zelldichte durchgeführt werden. Johnstone und Kollegen postulierten die Notwendigkeit einer Kondensation von Zellen für eine chondrogene Differenzierung [74]. Ein Ziel war es deshalb zu zeigen, dass eine Differenzierung auch überwiegend ohne Zell-Zell-Kontakte und somit ohne Kondensation der Zellen stattfinden kann. Des Weiteren sollte getestet werden, ob die enzymatisch vernetzten Gelatinegele den Metabolismus der eingebetteten Zellen bezüglich der Extrazellulärmatrixproduktion beeinträchtigen.

MSCs bestehen aus einzelnen Subpopulationen und besitzen das Potential, in verschiedene Gewebetypen zu differenzieren. Um eine qualitativ hochwertige chondrogene Differenzierung zu erhalten, sollten deshalb möglichst optimale Kultivierungsbedingungen für die MSC-Expansion als auch für die Differenzierung gefunden werden. Die Qualität der chondrogenen Differenzierung sollte dabei durch eine Analyse der Synthese knorpelspezifischer Moleküle überprüft werden.

Um MSC-Hydrogel-Komposite später in der Klinik einsetzen zu können, müssen die im Labor entwickelten Protokolle für Anwendungen im Patienten optimiert werden. Sämtliche verwendete Reagenzien müssen GMP-konform hergestellt werden. Zusätzlich müssen in den Patienten eingebrachte Materialien auf ihre Unbedenklichkeit getestet werden. Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Protokolle der MSC-Differenzierung so zu verändern, dass eine klinische Anwendung der MSCs möglich wäre. Die chondrogene Differenzierbarkeit der Zellen sollte dabei nicht vermindert werden.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Analysenwaage Excellence XS5205	Mettler-Toledo GmbH	Gießen
Autoklaven		
Systec VX-95 3870 ELV	Systec GmbH Tuttnauer Europe B.V.	Wettenberg Breda, NL
CO ₂ -Brutschränke		
APT- Line CB	BINDER GmbH	Tuttlingen
CASY [®] Cell Counter + Analyser Model TT	Innovatis AG	Bielefeld
Heizblock SHT200D	Stuart Scientific	Staffordshire, UK
Kryostat CM3050 S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar
Mikroskope + Kameras		
Axiovert 200M + AxioCam MRm Axiophot + AxioCam MRc 5	Carl Zeiss AG Carl Zeiss AG	Feldbach, CH Feldbach, CH
Neubauer-Zählkammer	Thermo Fisher Scientific Inc.	Pittsburgh, USA
PCR-Geräte	Applied Biosystems Deutschland GmbH	Darmstadt
7500 Fast Real-Time PCR System 7900HT Fast Real-Time PCR System		
pH-Meter S20 Seven Easy	Mettler-Toledo GmbH	Gießen
Photometer		
BioPhotometer NanoDrop	Eppendorf AG NanoDrop products	Hamburg Wilmington, USA
Mikroplattenlesegerät PHERAstar	BMG LABTECH GmbH	Offenburg
Schüttelgeräte		
REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach
Vortex Genie 2	Scientific Industries	New York, USA
Sterilwerkbänke		
BDK-S 1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH	Sonnenbühl
BDK-S 1800	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH	Sonnenbühl
Stickstofftank Taylor-Wharton 24K	tec-lab GmbH	Idstein
Thermocycler T3000	Biometra GmbH	Göttingen
Vakuumzentrifugensystem		
Vacuum Concentrator Kühlfalle Chemie-Hybrid-Pumpe RC5	BACHOFER GmbH & Co. KG BACHOFER GmbH & Co. KG Vacuubrand GmbH & Co. KG	Reutlingen Reutlingen Wertheim
Wasserbad SW-20C	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach
Zentrifugen		
Centrifuge 5424 Heraeus Megafuge 1.0R	Eppendorf AG Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG	Hamburg Bonn
Mikro 20 Rotofix 32	Andreas Hettich GmbH & Co. KG Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Tuttlingen Tuttlingen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	VWR International GmbH	Darmstadt
Einmalspritzen (2 ml, 5 ml)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Injektionskanüle (18G)	Terumo Medical Corporation	Somerset, USA
Kavitätenplatte (12 well, 24 well, 96 well)	BD Falcon Costar/Corning Greiner Bio-One GmbH	Heidelberg Amsterdam, NL Frickenhausen
Klebefolie (<i>MicroAmp® Optical Adhesive Film</i>)	Applied Biosystems Deutschland GmbH	Darmstadt
<i>Molecular Grinding Resin</i>	G-Biosciences	Maryland Heights, USA
Objektträger SuperFrost Plus	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG	Braunschweig
PCR-Gefäß (0,2 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
PCR-Platte (<i>Micro Amp Fast Optical 96 well Reaction Plate, 0,1ml</i>)	Applied Biosystems Deutschland GmbH	Darmstadt
Petrischalen	Corning	Amsterdam, NL
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml)	Costar/Corning	Amsterdam, NL
Pipettenspitzen (10 µm, 200 µm, 1 ml)	STARLAB GmbH	Ahrensburg
Pipettenspitzen TipOne mit Filter	STARLAB GmbH	Ahrensburg
Pistill (für 1,5 ml Reaktionsgefäße)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG Eppendorf AG	Karlsruhe Hamburg
Reinstwasseranlage Milli-Q Advantage	Millipore GmbH	Schwalbach/Ts.
Sterilfilter	Corning	Amsterdam, NL
UV-Küvette micro PLASTIBRAND	BRAND GmbH & Co. KG	Wertheim
Zellkulturflaschen	BD Falcon Greiner Bio-One GmbH	Heidelberg Frickenhausen
Zellsiebe (40 µm, 100 µm)	BD Falcon	Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Corning Greiner Bio-One GmbH	Amsterdam, NL Frickenhausen

2.3 Chemikalien und Enzyme

Alcianblau 8GX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	A3157
Calcein-AM	Molecular Probes / Invitrogen	Darmstadt	C3099
Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	C4384
L-Cysteinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	C1276
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	D9542
1,9-Dimethyl-methylenblau DMB	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg	20335
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	D5879
EDTA (Titriplex III)	Merck KGaA	Darmstadt	1.08418.1000
Eindeckmedium Neo-Mount	Merck KGaA	Darmstadt	1.09016.0500
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	9065
Ficoll-Paque PLUS Glycin	GE Healthcare	München	17-1440-02
Guanidiniumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt	1.04220.0100
Kollagenase B	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	11088815001

Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	3957
Methansäure	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	4724
Natriumazetat	Merck KGaA	Darmstadt	1.06268.1000
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	3957
Natriumformiat	Merck KGaA	Darmstadt	1.064.430.500
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	6771
Normalziegenserum			
Papain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	P4762
PBS	PAA	Pasching, A	H31-002
2-Propanol	Merck KGaA	Darmstadt	
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	P4170
Roti-Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	6640
Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium	Sakura Finetek Germany GmbH	Staufen	4583
Transglutaminase	GELITA AG	Eberbach	(19.06.07) 1007T014 (11.12.08)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	X100
Trypsin - EDTA	PAA	Pasching, A	L11-004
Tween20	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	9127
Wasser (Nuklease-frei)	Eppendorf AG	Hamburg	0032006.302
Ziegennormalserum	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.	Newmarket, UK	005000121

2.4 Fertigsets (*kits*)

Gewebe- homogenisierung	QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden Qiagen Inc., Valencia, USA	79654 79654
RNA-Isolierung	RNeasy Mini kit RNeasy Mini Plus kit	Qiagen GmbH, Hilden Qiagen Inc., Valencia, USA	74106 74134
DNase-Verdau	RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden	79254
Reverse Transkription	Reverse Transcriptase Core kit	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln	RT-RTCK -03
qPCR	qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I (Low ROX) SYBRGreen PCR Master Mix	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln Applied Biosystems, Foster City, USA	RT-SN2X- 03+WOU LR 4309155
sGAG- Bestimmung	Blyscan Glycosaminoglycan Assay	Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK	B1500

2.5 Spenderproben

Es wurden Knochenmarksaspirate von Spendern verwendet, welche ein künstliches Hüftgelenk bekamen. Die Aspirate wurden, im Rahmen einer von der lokalen Ethikkommission genehmigten Studie, von der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik in Tübingen zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden Knochenmarksaspirate von 34 verschiedenen Spendern (18 Frauen, 16 Männer) im Alter von 24 bis 89 Jahren und mit einem Durchschnittsalter von 66 Jahren (70 Jahre bei Frauen, 61 Jahre bei Männern) verwendet. Die im Labor Tuan verwendeten MSCs stammten vom Femur 11 verschiedener Spender (4 Frauen, 7 Männer). Diese waren im Alter von 31 bis 79 Jahren und hatten ein Durchschnittsalter von 58 Jahren (61 Jahre bei Frauen, 57 Jahre bei Männern).

2.6 Zellkulturmedien

2.6.1 Einfriermedium

Substanz	Firma	Stock	Endkonzentration	Menge (50 ml)
D-MEM (Low Glucose)	GIBCO (31885)	1 x		35 ml
DMSO	Sigma-Aldrich (D5879)	100 %	10 %	5 ml
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom (S 0115)	100 %	20 %	10 ml

Im Labor Tuan wurde fertiges Einfriermedium der Firma Invitrogen (*Recover Cell Culture Freezing Medium*, 12648010) verwendet.

2.6.2 MSC-Expansionsmedium

Standardexpansionsmedium

Substanz	Firma	Stock	Endkonzentration	Menge (250 ml)
D-MEM (Low Glucose)	GIBCO (31885)	1 x		143,7 ml
MCDB 201 Medium	Sigma (M-6770)	in H ₂ O lösen pH 7,3		95,8 ml
ITS+1 Liquid Media Supplement	Sigma (I2521)	100 x	1 x	2,5 ml
Penicillin-Streptomycin	GIBCO (15140-122)	100 x	1 x	2,5 ml
[bzw. Antibiotic-Antimycotic	GIBCO (15240-062, Labor Tuan)	100 x	1 x	2,5 ml]
L-Ascorbinsäurephosphat	Sigma (A8960)	50 mM in PBS	0.1 mM	0,5 ml
Dexamethason	Sigma (D2915)	1 mM in H ₂ O	0.05 µM	12,5 µl
Fötales bovines Serum (FBS)	Biochrom (S 0115)	100 %	2 %	5 ml
[bzw. MSC-qualifiziertes FBS	GIBCO (12662029, Labor Tuan)	100 %	10 %	25 ml]
Zytokinzusatz frisch vor Gebrauch				
PDGF-BB (human)	Miltenyi Biotech (130-093-982); R&D Systems (220-BB, Labor Tuan)	10 µg/ml	10 ng/ml	1 µl/ml Medium
EGF (human)	Strathmann Biotech (hEGF); Miltenyi Biotech (130-093-825, Labor Tuan)	10 µg/ml	10 ng/ml	1 µl/ml Medium

Expansionsmedium des Labors Tuan

Substanz	Firma	Stock	Endkonzentration	Menge (250 ml)
α -MEM (Low Glucose)	GIBCO (12571071)	1 x		222,5
MSC-qualifiziertes FBS	GIBCO (12662029)	100 %	10 %	25 ml
Antibiotic-Antimycotic	GIBCO (15240062)	100 x	1 x	2,5 ml
Zytokinzusatz frisch vor Gebrauch				
FGF-2 (human)	R&D Systems (233-FB)	25 μ g/ml	1 ng/ml	1 μ l/ 25ml Medium

2.6.3 Chondrogenes Differenzierungsmedium

Substanz	Firma	Stock	Endkonzentration	Menge (250 ml)
D-MEM (High Glucose)	GIBCO (41966; 11995 Labor Tuan)	1 x		240,8 ml
L-Ascorbinsäurephosphat	Sigma (A8960)	50 mM in PBS	0.17 mM	0,85 ml
Natriumpyruvat MEM	GIBCO (11360)	100 mM	1 mM	2,5 ml
L-Prolin	Sigma (P5607)	0.1 M in PBS	0.35 mM	0.875 ml
Penicillin-Streptomycin	GIBCO (15140-122)	100 x	1 x	2,5 ml
[bzw. Antibiotic-Antimycotic	GIBCO (15240-062, Labor Tuan)	100 x	1 x	2,5 ml]
Dexamethason	Sigma (D2915)	1 mM in H ₂ O	0.1 μ M	25 μ l
ITS+1 Liquid Media Supplement	Sigma (I2521)	100 x	1 x	2,5 ml
Zytokinzusatz frisch vor Gebrauch				
TGF- β 3 (human)	Miltenyi Biotech (130-094-008)	5 μ g/ml	10 ng/ml	2 μ l/ml Medium

2.7 Gelatinegele

2.7.1 Gelatine-Gellösung

- 550 mg Gelatine (*GELITA AG*; Eberbach; 325109, 27.04.09; 318395 Typ A, 19.06.07; aus Schweinehaut) zu 5 ml PBS geben
- 2 Stunden bei 75 °C pasteurisieren
- pH 7 durch 0,8 % 0,5 M NaOH
- über Nacht bei 50 °C homogenisieren
- Lagerung bei -20 °C

2.7.2 Gelatine-HA-Gellösung

- 550 mg Gelatine (*GELITA AG*, Eberbach; 325109, 27.04.09; 318395 Typ A, 19.06.07; aus Schweinehaut) und 1 ml *Visiol* (20 mg HA/ml; *TRB Chemedica AG*, Haar) zu 4 ml PBS geben
- 2 Stunden bei 75 °C pasteurisieren
- pH 7 durch 1,4 % 0,5 M NaOH
- über Nacht bei 50 °C homogenisieren
- Lagerung bei -20 °C

2.8 Lösungen und Puffer

2.8.1 Lösungen für die Alcianblaufärbung

Azetatpuffer (0,05 M; 2x)

2,05 g	Natriumazetat	(0,05 M)
500 µl	Tween20	(0,1 %)
ad. 500 ml	Reinstwasser	
pH auf 6,8 einstellen		

Magnesiumchloridlösung (1,5 M)

304,95 g	MgCl ₂ ·6H ₂ O	(1,5 M)
500 ml	0,05 M Azetatpuffer	(0,025 M)
ad. 1 l	Reinstwasser	
pH = 5,8		

Alcianblaulösung

1 Volumenanteil	0,1 % Alcianblau 8GX (in Reinstwasser)	(0,023 %)
1 Volumenanteil	0,05 M Azetatpuffer	(0,012 M)
pH auf 5,8 einstellen		
2,29 Volumenanteile	1,5 M MgCl ₂ -Lösung	(0,8 M)
Lösung filtrieren und direkt verwenden, immer frisch ansetzen		

2.8.2 Lösungen für die sGAG-Bestimmung

Papainpuffer

2,05 g	Natriumazetat	(0,1 M)
0,39 g	L-Cysteinhydrochlorid	(0,01 M)
4,65 g	EDTA	(0,05 M)
2,92 g	Natriumchlorid	(0,2 M)

ad. 230 ml Reinstwasser

pH auf 8,0 voreinstellen

auf ca. 40°C erwärmen und gut rühren (Lösen des EDTA)

ad. 250 ml Reinstwasser

pH auf 6,0 einstellen

Lösung ist etwa 3 Monate haltbar

Papainlösung

10 mg Papain pro ml Reinstwasser lösen (etwa eine Woche bei 4 °C haltbar)

Lösung direkt vor Gebrauch 1:10 in Papainpuffer verdünnen (Endkonzentration 1 mg/ml)

DMB-Lösung

Lösung 1:

0,376 g	Glycin	(10 mM)
0,292 g	NaCl	(10 mM)
ad. 450 ml	Reinstwasser	

pH auf 3,0 einstellen

Lösung 2:

5 ml	Ethanol
8 mg	DMB

20 min Schütteln

Lösungen 1 und 2 mischen

ad. 500 ml Reinstwasser

optische Dichte sollte bei 530 nm zwischen 0,39 und 0,41 liegen

Lösung ist etwa 3 Monate im Dunkeln haltbar

3 METHODEN

3.1 Isolierung mesenchymaler Vorläuferzellen (MSCs) aus dem Knochenmark

Die in der Arbeit verwendeten MSCs wurden aus dem Knochenmark des Femurkopfes humaner Spender gewonnen. Die von der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen erhaltenen Knochenmarksaspirate (4 bis 40 ml, mit Heparin versetzt, Abbildung 5A) wurden im doppelten Volumen PBS resuspendiert und 10 min bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand inklusive der Fettschicht wurde entfernt und das Sediment mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in PBS aufgenommen (Abbildung 5B) und Knochenfragmente und Zellaggregate entfernt, indem die Zellsuspension über ein 100 µm-Zellsieb filtriert wurde. Anschließend wurde die Suspension vorsichtig auf eine das halbe bis einfache Zellvolumen umfassende *Ficoll-Paque PLUS*-Lösung geschichtet (Abbildung 5C) und für eine halbe Stunde bei 400 x g zentrifugiert (Zentrifuge darf nicht abbremesen). Die durch den Dichtegradienten entstandene Interphaseschicht (Abbildung 5D) wurde abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Die gewaschenen Zellen (10^5 bis 10^8 pro ml Knochenmark) wurden anschließend in Expansionsmedium (siehe Abschnitt 2.6.2) aufgenommen und in Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro cm^2 ausgesät. Die Lebendzellzahl wurde mit dem *CASY[®] Cell Counter + Analyser Model TT* bestimmt. Nach ein bis zwei Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt um nicht-adhärenente Zellen (unter anderen Lymphozyten) zu entfernen. Adhärenente Zellen wurden als MSCs definiert. Das Vorhandensein typischer Oberflächenantigene für MSCs nach derartiger Isolierung wurde stichprobenartig in der Arbeitsgruppe mittels Durchflusszytometrie bestätigt [122].

In dieser Arbeit wurden überwiegend vorhandene, kryokonservierte MSCs verwendet.

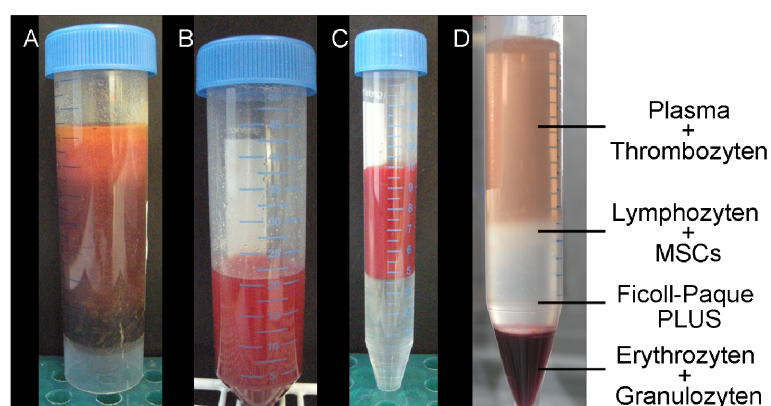


Abbildung 5: MSC-Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation. Das Knochenmark (A) wurde mit PBS gewaschen (B) und auf *Ficoll-Paque PLUS*-Lösung geschichtet (C). Nach der Zentrifugation konnten MSCs aus der Interphaseschicht isoliert werden (D).

Während eines Gastaufenthalts im Labor Tuan in Pittsburgh wurde die MSC-Isolierung wie folgend beschrieben durchgeführt. Hier wurden die Knochenbälkchen (Spongiosa) des Spenderfemurs mit einer Knochenzange in eine Petrischale mit vorgelegtem α -MEM überführt und mit Scheren zerkleinert. Das dabei austretende Knochenmark wurde über ein 40 μ m-Zellsieb filtriert. Die Knochenstückchen wurden darauf folgend noch einmal mit α -MEM gewaschen und dieses Medium mit dem restlichen ausgetretenen Knochenmark ebenfalls über das Zellsieb filtriert. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden zweimal mit α -MEM gewaschen und ohne Dichtegradientenzentrifugation direkt in Expansionsmedium (Zusammensetzung nach Protokoll des Labors Tuan) aufgenommen, mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt und in Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2 Expansion und Lagerung von MSCs

MSCs wurden bis etwa 80 % Konfluenz in Expansionsmedium (siehe Abschnitt 2.6.2) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Expandierte Zellen wurden mit 0,05 % Trypsin in 0,02 % EDTA vom Kulturflaschenboden gelöst, gewaschen, in Einfriermedium (siehe Abschnitt 2.6.1) resuspendiert und bis zum Gebrauch in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

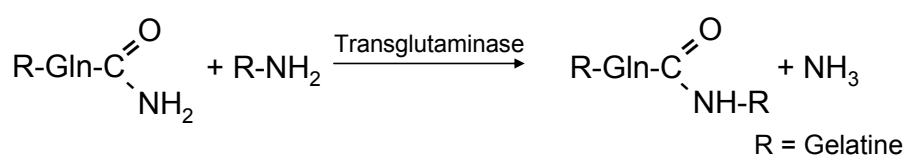
Für Experimente wurden die eingefrorenen MSCs im Wasserbad erwärmt und kurz bevor sie komplett aufgetaut waren sofort in Zellkulturflaschen mit vorgelegtem Expansionsmedium überführt. Je 125 cm² Kulturflasche wurden so 0,5 Millionen MSCs (überwiegend Passage 1) ausgesät. Das Medium wurde erstmals am folgenden Tag und danach zweimal wöchentlich gewechselt. Bei etwa 80 % Konfluenz wurden die Zellen erneut mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst und für Folgeexperimente verwendet.

3.3 Herstellung hochdichter Mikromassekulturen

Für die Herstellung hochdichter Sphäroidkulturen, auch Mikromassekulturen genannt, wurden 2×10^7 MSCs in einem Milliliter Zellkulturmedium resuspendiert. Je 20 μ l dieser Suspension (0,4 Millionen Zellen enthaltend) wurden für die Mikromasseherstellung in die Mitte von einer Kavität (U-Form) einer 96 well-Platte pipettiert. Die dafür verwendete Platte durfte keine Beschichtung für Zellkulturen aufweisen um ein Adhären der Zellen auf dem Zellkulturboden zu vermeiden. Nach einer Stunde im Brutschrank konnte auf die Zellen vorsichtig Kulturmedium gegeben werden. Der gebildete Sphäroid wurde nach etwa drei Tagen in eine Kavität einer 12 well-Platte mit 0,75 ml Medium pro Mikromasse überführt, um eine Limitation der Nährstoffversorgung zu vermeiden.

3.4 Herstellung zelleingebetteter Gelatine- und Gelatine-Hyaluronan (HA)-Gele

Die Gelatine- (siehe Abschnitt 2.7.1) bzw. Gelatine-HA-Lösung (siehe Abschnitt 2.7.2) wurde im Heizblock bei 37 °C verflüssigt. Pro 500 µl Gel wurden 0,4 Millionen MSCs in 50 µl Medium resuspendiert und 15 µl Transglutaminase zugegeben. Transglutaminase katalysiert kalziumabhängig den Acyl-Transfer proteingebundenen Glutamins auf primäre Amine und vernetzt somit Gelatine zu einem Hydrogel (Formel 1). Die Konzentration des Enzyms wurde vor Experimentbeginn austitriert. Die Konzentration bei der innerhalb von 30 min ein Hydrogel entstand wurde für Experimente herangezogen (hier 10 und 50 U/ml je nach Transglutaminase-Charge). Zu der Enzym-Zell-Suspension wurden sofort 450 µl der Gelatine- bzw. Gelatine-HA-Lösung gegeben und zur Homogenisation das Gemisch mit einer Spritze (18 G Kanüle) mehrmals aufgezogen und wieder abgelassen (ohne Luftblasen zu erzeugen!). 500 µl der homogenisierten Suspension wurden anschließend in eine Kavität einer 24 well-Platte überführt und in den Brutschrank gestellt. Nach etwa 45 min wurde das entstandene Hydrogel mit 1,5 ml Kulturmedium überschichtet.



(Formel 1)

3.5 Bestimmung der Hydrogelstabilität im Kultivierungsverlauf

Um zu bestimmen, ob die Hydrogele während der Kultivierung *in vitro* stabil bleiben, wurden Gelatine-HA-Gele mit eingebetteten MSCs über einen Zeitraum von 4 Wochen kultiviert und die Stabilität alle drei bis vier Tage subjektiv eingeschätzt. Hierfür wurde die Stabilität der Gele in 6 Stufen eingegliedert:

Stabilität 1 – Gel wurde abgebaut

Stabilität 2 – Gel wurde fast abgebaut, der Zellkulturboden war nur noch teilweise bedeckt

Stabilität 3 – Gel wurde stark abgebaut, der Zellkulturboden war aber noch bedeckt

Stabilität 4 – Gel wurde teilweise abgebaut

Stabilität 5 – weichere Gelkonsistenz

Stabilität 6 – stabiles Gel

Die Gelstabilität der Stufen 3 und 5 ist in Abbildung 6 exemplarisch dargestellt.

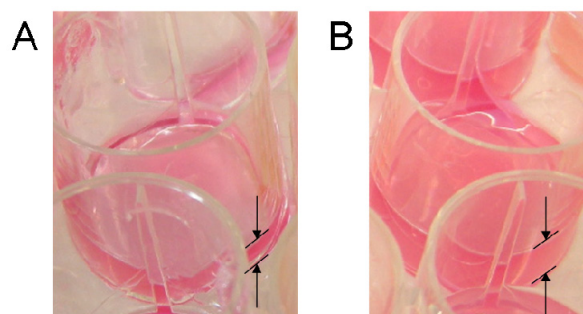


Abbildung 6: Einstufung der Gelstabilität während der Kultivierung von MSCs in Hydrogelen. Dargestellt ist ein Gel der Stabilität 3 (A) und der Stabilität 5 (B). Das Gel der Stabilität 3 zeigt im Gegensatz zu dem der Stabilität 5 einen starken Abbau. Das Gel ist sehr dünn, der Boden der 24 well-Platte gerade noch bedeckt.

3.6 Größenmessung von Mikromassen

Für die Bestimmung der Größe von Mikromassekulturen wurden diese im Hellfeld mikroskopiert. Der Umriss eines Sphäroids wurde gekennzeichnet und der daraus resultierende Flächeninhalt mit Hilfe der *AxioVision* Software von *Carl Zeiss MicroImaging* ermittelt (Abbildung 7).

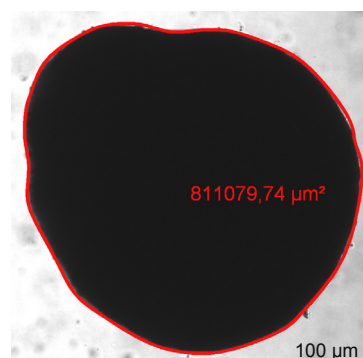


Abbildung 7: Bestimmung des Flächeninhalts einer Mikromasse. Der Umriss wird in der *AxioVision* Software definiert und der resultierende Querschnittsflächeninhalt errechnet.

3.7 Lebend- und Totzellzahlbestimmung in Hydrogelen

Die Viabilität kultivierter MSCs in Hydrogelen wurde durch Auszählen Calcein-gefärbter Zellen ermittelt („Lebend“-Färbung). Um die Lebendzellanzahl innerhalb einzelner Bildebenen bestimmen zu können wurden hierfür optische Schnitte einzelner Gelebenen mit Hilfe des *ApoTome*-Moduls angefertigt. Die Totzellzahl wurde technisch auf gleichem Weg bestimmt, wobei die DNA toter Zellen mit Propidiumiodid angefärbt wurde.

3.7.1 Calcein-Färbung

Für die Calcein-Färbung wurde Calcein-bis-acetoxymethylester (Calcein-AM) als Vitalfarbstoff verwendet. Calcein-AM ist ein Fluorescein-Derivat welches durch die Zellmembran in die Zelle gelangt und dort von Esterasen in Calcein umgewandelt wird. Calcein komplexiert daraufhin das in den Zellen enthaltene Kalzium und wird membranundurchlässig, woraus ein detektierbares Fluoreszenzsignal in den Zellen resultiert. Da nur lebende Zellen Esterasen synthetisieren, fungiert Calcein-AM als Lebendzellfarbstoff.

Für die Färbung wurde von dem Hydrogel ein Teilstück abgetrennt und in die Kavität einer 12-well-Platte überführt. Zu dem Gelstück wurde Medium gegeben, welches Calcein-AM in einer Verdünnung von 1:1000 (Stocklösung 1 mg/ml in DMSO) enthielt. Es folgte eine Inkubation für 20 min im Brutschrank. Das Medium wurde daraufhin entfernt und das Gel für 10 min in PBS gewaschen, bevor es mikroskopiert wurde.

Die Calcein-Färbung wurde über einen Zeitraum von 10 Wochen einmal wöchentlich an der gleichen Hydrogelkultur durchgeführt, um den Verlauf der Lebendzellanzahl verfolgen zu können.

3.7.2 Propidiumiodid-Färbung

Um zu bestimmen wie lange tote Zellen in den Gelatinegelelen nachweisbar sind, wurden MSCs mit Ethanol und Triton X-100 getötet, in ein Gelatine-HA-Gel eingebettet und für 8 Wochen kultiviert. Einmal pro Woche wurde von dem Gel ein Teilstück abgetrennt und in die Kavität einer 12-well-Platte überführt. Zu dem Gelstück wurde Medium gegeben, welches Propidiumiodid in einer Verdünnung von 1:150 (Stocklösung 333 µg/ml in DMSO) enthielt. Propidiumiodid ist ein Nukleinsäureinterkalator, dessen Fluoreszenz nach der Interkalation in die DNA detektiert werden kann. Da der Farbstoff nicht membrangängig ist, können somit nur tote Zellen detektiert werden. Das Gel wurde für 20 min in der Propidiumiodidlösung aufbewahrt um zu gewährleisten, dass der Interkalator in das Gel hinein diffundiert. Nach dem Färben wurde das Gel für 10 min in PBS gewaschen, bevor es mikroskopiert wurde.

3.7.3 Präparatvorbereitung

Um eine Bewegung des Hydrogels während der mikroskopischen Aufnahme zu vermeiden wurde ein Objektträger zuvor folgendermaßen vorbereitet. Auf den Objektträger wurden zwei Plastikstege als Abstandshalter so aufgebracht, dass das gefärbte Gelstück zwischen diese gelegt werden konnte (Abbildung 8A+B). Ein Deckglas wurde auf dem Objektträger mit Klebeband so fixiert, dass das Gel zwischen Objektträger und Deckglas etwas

zusammengedrückt wurde (Abbildung 8C). Somit war das Gel auf dem Objektträger fixiert und konnte mikroskopiert werden.

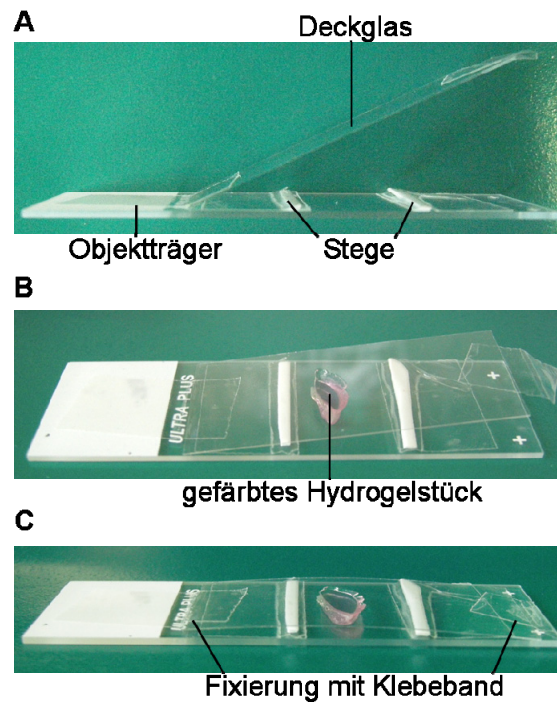


Abbildung 8: Vorbereitung eines Objektträgers für Aufnahmen am *ApoTome*. Auf den Objektträger werden zwei Plastikstäbe so aufgebracht (A), dass der gefärbte Teil des Hydrogels dazwischen gelegt werden kann (B). Das Gelstück wird zwischen Objektträger und Deckglas leicht zusammengedrückt (C) und kann mikroskopiert werden.

3.7.4 z-Stapelaufnahmen am *ApoTome*

Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie von Hydrogelen gibt es durch deren Dreidimensionalität Überstrahlungen aus anderen Fokusebenen, da die Optik für die Untersuchung sehr dünner Präparate optimiert ist. Es gibt verschiedene Methoden, um diesen Effekt zu reduzieren: die konfokale Laser Scanning Mikroskopie, die 3D Dekonvolution und das *ApoTome*. In dieser Arbeit wurde das *ApoTome*-Modul bei der Fluoreszenzmikroskopie von Hydrogelen verwendet. Mit dem *ApoTome* von *Carl Zeiss MicroImaging* (Abbildung 9) können überstrahlungsfreie optische Schnitte von Fluoreszenzpräparaten angefertigt werden, indem eine Gitterstruktur in die Ebene der Leuchtfeldblende des Auflichtstrahlengangs eingebracht wird (Prinzip der Streifenprojektion). Durch den definierten lateralen Versatz des Transmissionsgitters und der Verrechnung der in jeder Gitterposition erstellten Rohbilder kann ein präziser optischer Schnitt mit erhöhtem Kontrast dargestellt werden (Abbildung 10).

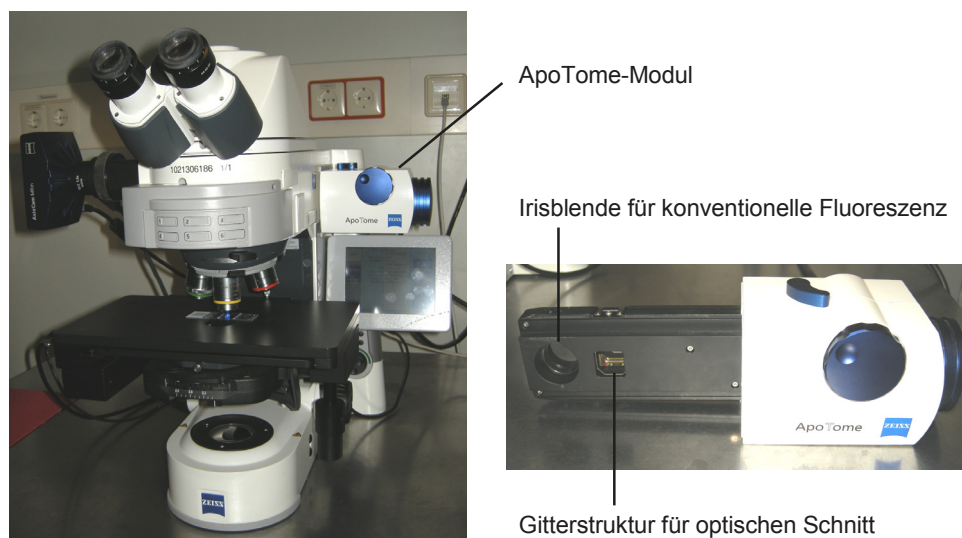


Abbildung 9: Zeiss-Mikroskop mit ApoTome-Modul. Das ApoTome (rechte Abbildung) wird in den Strahlengang des Mikroskops eingeschoben. Durch die Aufnahme versetzter Gitterstrukturen kann ein optischer Schnitt in der Fokusebene errechnet werden.

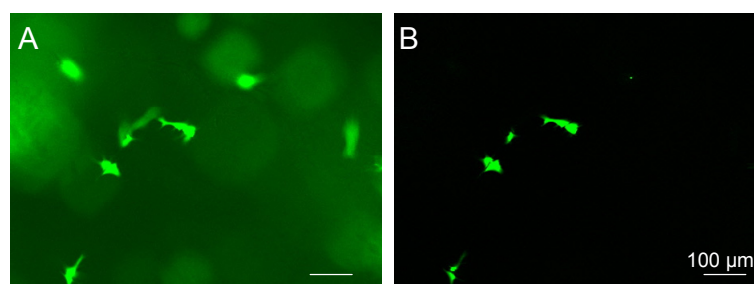


Abbildung 10: Aufnahme von Calcein-gefärbten MSCs in einem Gelatinegel mit konventioneller Fluoreszenz (A) und im ApoTome-Modus (B). Durch das ApoTome konnte ein erhöhter Kontrast in der Fokusebene erreicht werden.

Folgende Einstellungen wurden an der *AxioVision* Software vorgenommen, um Aufnahmen von Hydrogelen mit dem ApoTome vorzunehmen. Für optimale Aufnahmen mit dem Objektiv *Plan-APOCHROMAT 10x/0,45* wurde das Transmissionsgitter *L1* eingesetzt, die Mittelung für die Rauschunterdrückung auf 3 gesetzt und eine mittlere Filterung eingestellt. Um das Ausbleichen der Probe während der Aufnahme zu reduzieren, sollte die Aufnahmezeit möglichst gering bleiben. Bei den oben genannten Einstellungen wird ein Bild bereits aus 9 Einzelbildern verrechnet (3 Gitterverschiebungen x 3 Bilder zur Rauschunterdrückung). Um die Belichtungszeit dennoch gering zu halten, wurde das Binning der Kamera auf Kosten der Auflösung auf 3x3 (460 x 344 Pixel) erhöht.

Für die Aufnahme der Färbungen wurden folgende Filter verwendet: für Calcein (Abs. 495 nm; Em. 515 nm) der Filtersatz *38 HE* von Zeiss (Abs. BP 470/40; FT 495; Em. BP 252/50), für das

interkalierte Propidiumiodid der Filtersatz 45 von Zeiss (Abs. BP 560/40; FT 585; Em. BP 630/75).

Mit dem Modus z-Stapel ist es möglich, Serienaufnahmen über einen vorher bestimmten Fokusbereich durchzuführen. Um die mittlere Anzahl an Zellen in einer Ebene bestimmen zu können, wurden z-Stapel mit Abstand von je 25 µm erstellt. Die Zellen pro Bildebene in z-Richtung wurden gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte der an mindestens drei Stellen des Gels bestimmten Zellzahlen wurden erneut gemittelt und die Zellzahl direkt nach Einbettung in das Hydrogel als 100 % festgelegt. Somit konnte der prozentuale Anteil, bezogen zur Ausgangszellzahl nach Hydrogeleinbettung, im Verlauf der Kultivierung bestimmt werden.

Für eine dreidimensionale Darstellung vitaler Zellen in Hydrogelen wurden z-Stapel mit optimalem Abstand (1,68 µm für die maximale Auflösung in z-Richtung) erstellt. Die Einzelbilder der Stapel wurden von der *AxioVision* Software in eine räumliche Darstellung umgewandelt.

3.8 Relative Quantifizierung der Markergenexpression

Als Standardverfahren zur Analyse der Genexpression wurde die Reverse Transkriptions-*realtime*-Polymerasenkettenreaktion (RT-qPCR) eingesetzt. Für die Quantifizierung der Markergenexpression wurde RNA aus Zellen isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA mit Primern amplifiziert, welche spezifisch an Sequenzen der Markergen-cDNA binden. Die Expression der Markergene wurde für die relative Quantifizierung auf die Expression des Referenzgens normiert. Ein geeignetes Referenzgen wurde zu Beginn der Arbeit ermittelt.

3.8.1 Herstellung von Zelllysaten

Um RNA aus in Hydrogel-eingebetteten MSCs zu isolieren, mussten die Gele zuvor enzymatisch mit Kollagenase B verdaut werden. Es wurden jeweils zwei bis vier Gele für die RNA-Isolierung zusammengeführt, um eine für die RT-qPCR ausreichende RNA-Menge zu erhalten. Kollagenase B spaltet spezifisch X-Gly-Bindungen in Pro-X-Gly-Pro-Sequenzen, welche häufig in Kollagenen gefunden werden. Da neben der Kollagenase auch weitere Proteasen in dem verwendeten Enzymlyophilisat enthalten sind, erfolgte hier ein effektiver Abbau. Pro 500 µl Gelatinegel wurde 1 ml einer 4 mg/ml Kollagenase-Lösung (in D-MEM) zugegeben. Das Gel wurde mechanisch in kleine Stücke geteilt und die Suspension für etwa 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 160 x g wurde das Zellsediment in 350 µl *RLT*-Puffer (*RNeasy Mini kit*, *Qiagen*) lysiert.

Mikromassen wurden direkt in *RLT*-Puffer lysiert. Hierfür wurden mindestens zwei Sphäroide in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, welches *Molecular Grinding Resin*-Kunstharzgranulat

in 30 µl *RLT*-Puffer enthielt. Die Mikromassekulturen wurden mit Hilfe eines Pistills zerrieben. Auf das Lysat wurden 320 µl *RLT*-Puffer gegeben.

MSC Monolayer wurden mit 0,05 % Trypsin in 0,02 % EDTA vom Kulturflaschenboden gelöst, zentrifugiert und die Zellen in 350 µl *RLT*-Puffer aufgenommen.

Alle Pipettierschritte ab der Zelllyse wurden mit gefilterten Pipettenspitzen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Zelllysate wurden bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert.

3.8.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus Zelllysaten erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini kits (Qiagen)* nach Anweisung des Herstellers. Das Zelllysate wurde bei Raumtemperatur auf eine *QIAshredder*-Säule gegeben und zur Herstellung einer homogenen Lösung 2 min bei 12000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde es mit gleichem Volumen 70 %igen Ethanols gemischt und auf eine *RNeasy*-Säule gegeben. Nach der Zentrifugation für 15 s bei 10000 x g wurde die Säule mit der gebundenen RNA mit *RW1*-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde ein DNase-Verdau mittels *RNase-Free DNase Set* durchgeführt. Dafür wurde auf die Säule eine Lösung von 5 µl *DNase I* in 35 µl *RDD*-Puffer pipettiert und für 15 min inkubiert. Nach dem Verdau wurde die Säule einmal mit 350 µl *RW1*-Puffer und zweimal mit 500 µl *RPE*-Puffer gewaschen und jedes Mal für 15 s bei 10000 x g zentrifugiert. Zur Trocknung der Membran wurde die Säule in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut für 2 min zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Es wurde zweimal 24 µl Nuklease-freies Wasser in die Säule pipettiert und diese jeweils für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Die RNA-Isolierung im Labor Tuan erfolgte mit dem *RNeasy Plus Mini kit (Qiagen)*. Abweichend vom oben beschriebenen Protokoll ist, dass hier der DNase-Verdau auf der Säule entfällt. Direkt nach dem Homogenisieren mittels *QIAshredder* wird das Zelllysate auf eine gDNA-Eliminationssäule gegeben und für 30 s bei 10000 x g zentrifugiert.

3.8.3 Reverse Transkription (RT)

Die Konzentrationen der RNA-Proben wurden am *BioPhotometer (NMI)* bzw. am *NanoDrop* (Labor Tuan) bestimmt und danach eine RNA-Verdünnung von maximal 1 µg RNA in 20,25 µl RNase-freiem Wasser hergestellt. Diese Proben wurden im Thermocycler für 5 min bei 72 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Die reverse Transkription wurde mit dem *Reverse Transcriptase Core kit* von *Eurogentec* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu der RNA-Probe wurde ein Mix aus 5 µl Reaktionspuffer, 10 µl 25 mM MgCl₂, 10 µl 2,5 mM dNTP, 2,5 µl Oligo d(T)-Primer, 1 µl RNase-Inhibitor und 1,25 µl *EuroScript RT* gegeben. Die Lösung

wurde im Thermocycler 10 min bei 25 °C (Primerbindung), 30 min bei 48 °C (reverse Transkription) und 5 min bei 95 °C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase) inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Als Kontaminationskontrolle wurde ein Ansatz mit Nuklease-freiem Wasser anstelle von RNA mitgeführt (RT-Kontrolle).

Neben den MSC-Proben wurde auch RNA aus kultivierten Chondrozyten hyalinen Knorpels und aus kultivierten Bandscheibenzellen revers transkribiert. Die RNA-Proben wurden von Kollegen der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

3.8.4 RT-*realtime*-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Um eine zuverlässige Quantifizierung der Genexpression durchführen zu können, muss einiges beachtet werden. So ist z. B. die Wahl der Primer, die Bestimmung der PCR-Effizienz und die Verwendung geeigneter Referenzgene für die Qualität einer relativen Quantifizierung von enormer Bedeutung. Zusätzlich sind die Aufbereitung und die Lagerung der Proben kritische Faktoren bei der PCR [123-125].

3.8.4.1 Primerkonstruktion

Die Wahl der Primer ist sehr wichtig, da diese die Effizienz der PCR beeinflussen. Um eine möglichst hohe Ausbeute an spezifischen PCR-Produkten zu erhalten, sollten die Primer folgenden Anforderungen genügen [125-127]:

1. Primer sollten aus 18 bis 22 Basenpaare aufgebaut sein, so dass sie spezifisch und bei angemessenen Temperaturen an der cDNA-Matrize binden können.
2. Die letzten 5 Basen vom 3'-Ende der Primer sollten Guanin (G) oder Cytosin (C) enthalten, um eine stärkere Bindung zur DNA-Matrize zu erhalten (3 Wasserstoffbrückenbindungen anstatt 2 bei Thymin und Adenin). Mehr als 3 aufeinander folgende Gs oder Cs sollten jedoch vermieden werden. Insgesamt sollte der GC-Gehalt zwischen 40 % und 60 % liegen.
3. Die Schmelztemperatur (T_s) der Primer sollte möglichst gleich und bei etwa 60 °C liegen. Höhere Schmelztemperaturen können zu unspezifischen Anlagerungen an der Matrize führen.
4. Die Primer und die zu amplifizierende cDNA sollten keine Sekundärstrukturen ausbilden.
5. Primer sollten nicht für Sequenzen entwickelt werden, welche hohe Kreuzhomologien zu anderen Genen aufweisen.
6. Primer sollten möglichst am 3'-Ende der cDNA-Matrize binden.
7. Amplifizierte Sequenzen sollten zwischen 50 und 150 Basenpaare lang sein.
8. Primer sollten möglichst Exon-Exon-Grenzen mit langer Intron-Sequenz überspannen, um DNA-Kontaminationen bei der Amplifikation auszuschließen.

Primer für folgende Gene wurden am NMI mit der Software *Primer Express* (*Applied Biosystems*) konstruiert: Aggrekan (ACAN), Alkalische Phosphatase (ALPL), Kollagen Typ I Alpha 2 (COL1A2), Kollagen Typ X Alpha 1 (COL10A1), Hyaluronansynthase 2 (HAS2),

Hyaluronansynthase 3 (HAS3), *SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox-9)* und *melanoma inhibitory activity (MIA; auch: cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein CD-RAP)*.

Die Primersequenzen für Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthinphosphoribosyltransferase I (HPRT I), Ubiquitin C (UBC), *Tyrosin 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta polypeptide (YWHAZ)* (alle von [128]), Beta-Aktin (ACTB; [129]) und Kollagen Typ II Alpha I (COL2A1; [130]) wurden aus der Literatur übernommen. Die Spezifität der Primer wurden mit der *BLAST*-Analyse [131] überprüft.

Die sense (s)- und antisense (a)-Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Primer, deren *NCBI*-Referenzsequenznummern (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), GC-Gehalt, ob sie Exon-Exon-Grenzen überspannend sind, die Länge der amplifizierten Sequenzen und deren Schmelztemperaturen sind in Tabelle 1 dargestellt. Alle Primer wurden von der *BioTeZ Berlin Buch GmbH* synthetisiert.

Tabelle 1: Primer für die RT-qPCR

Gen	Referenzsequenz	Primer			Amplikon			Quelle	
			Sequenz	Basenpaare	% GC	Exon-Exon	Basenpaare		T _s (°C)
GAPDH	NM_002046	s	TGCACCACCAACTGC TTAGC	20	55	ja	87	79	[128]
		a	GGCATGGACTGTGGT CATGAG	21	57				
HPRT I	NM_000194	s	TGACACTGGCAAAC AATGCA	21	43	ja	94	78	[128]
		a	GGTCCTTTTCACCAG CAAGCT	21	52				
UBC	M26880	s	ATTTGGGTCGCGGTT CTTG	19	53	ja	133	81	[128]
		a	TGCCTTGACATTCTC GATGGT	21	48				
YWHAZ	NM_003406	s	ACTTTTGGTACATTGT GGCTTCAA	23	39	nein	94	77	[128]
		a	CCGCCAGGACAAAC CAGTAT	20	55				
ACTB	NM_001101	s	GCCCTGAGGCACTCT TCCA	19	63	ja	103	81	[129]
		a	TTGCGGATGTCCACG TCA	18	56				
ACAN	NM_013227	s	TGCATTCCACGAAGC TAACCTT	22	45	nein	84	79	Barbara Platz, NMI
		a	GACGCCTCGCCTTCT TGAA	19	58				
ALPL	NM_000478	s	TTCCCACGTCTTCAC ATTTGG	21	48	ja	114	80	Jana Müller, NMI
		a	TTGCCATACAGGATG GCAGTG	21	52				
COL1A2	NM_000089	s	GCTGGCAGCCAGTTT GAATATAAT	24	42	ja	78	75	Barbara Platz, NMI
		a	CAGGCGCATGAAGG CAAGT	19	58				

(Fortsetzung nächste Seite)

(Fortsetzung von vorheriger Seite)

Gen	Referenzsequenz	Primer			Amplikon			Quelle	
			Sequenz	Basenpaare	% GC	Exon-Exon	Basenpaare		T _s (°C)
COL2A1	NM_001844	a	GTCGTCGCAGAGGA CAGTCC	20	65	nein	83	77	[130]
		s	AGAGGTATAATGATA AGGATGTGTGGAAG	29	38				
COL10A1	NM_000493	s	CACGCAGAATCCATC TGAGAAT	22	45	nein	93	76	Jana Müller, NMI
		a	CGTTCAGCGTAAAAC ACTCCAT	22	45				
HAS2	NM_005328	s	GACCCGTTGGAGCAA GTCCTA	21	57	nein	151	78	Jana Müller, NMI
		a	ACCCCGGTAGAAGA GCTGGAT	21	57				
HAS3	NM_005329	s	CGGTGGCTCAACCA GCAA	18	61	nein	128	81	Jana Müller, NMI
		a	GTATAACCGTGGCAA TGAGGAAGA	24	46				
MIA	NM_006533	s	CCCAGTAGCATTGTC CGAGA	20	55	ja	82	77	Jana Müller, NMI
		a	GGCAGTAGAAATCCC ATTTGTCT	23	43				
Sox-9	NM_000346	s	ATCCAAGCGCATTAC CCACT	20	50	nein	132	80	Jana Müller, NMI
		a	CGATTCTCCATCATC CTCCAC	21	52				

3.8.4.2 Ablauf der qPCR

Für die qPCR wurde am NMI für das PCR-Gerät *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* und der *qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I* von *Eurogentec* verwendet. Im Labor Tuan, wurde der *SYBR Green PCR Master Mix* von *Applied Biosystems* mit dem PCR-Gerät *7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)* verwendet.

Für jedes Primerpaar wurde direkt vor dem Start der PCR ein PCR-Mastermix pipettiert, der aus 12,5 µl 2 x PCR-Puffer (enthält dNTP/dUTP, Polymerase [*HotGoldStar* bzw. *AmpliTaq Gold*], MgCl₂, *SYBR Green I*, Stabilisatoren und Referenzfarbstoff) und je 5 µl 1,5 µM sense- und antisense-Primern (Endkonzentration: je 300 nM) pro 2,5 µl cDNA-Probe bestand. Die optimalen Konzentrationen der Primer wurden zuvor mit Verdünnungsreihen bestimmt.

In die Kavität einer PCR-Platte wurden zu je 2,5 µl cDNA 22,5 µl des PCR-Mastermixes pipettiert. Anschließend wurde die PCR-Platte mit einer Klebefolie verschlossen um Kontaminationen zu vermeiden. Nach der Zentrifugation für 15 s bei 500 x g wurde die Platte in das PCR-Gerät gestellt und folgendes Programm in der Software (*Sequence Detection System Software, Applied Biosystems*) gestartet:

10 min	95 °C	} Polymerase-Aktivierung
15 s	95 °C	
30 s	60 °C	} 40 Zyklen
30 s	72 °C	
15 s	95 °C	} → Datensammlung
1 min	60 °C	
15 s	95 °C	} Schmelzanalyse
15 s	60 °C	
		(vom PCR-Gerät optimiert)

Zu jedem Primerpaar wurde immer eine Kontaminationskontrolle mitgeführt, bei welcher 2,5 µl der RT-Kontrolle (Abschnitt 3.8.3) anstelle der cDNA verwendet wurden.

Die gewählte Annealing-Temperatur lag für die in Tabelle 1 angegebenen Primer bei 60 °C. Die Wahl einer zu hohen Annealing-Temperatur würde zu unzureichender Primer-Matrizen-Hybridisierung führen. Dies würde in einer verringerten Produktausbeute resultieren (und zu einer Verringerung der Amplifikationseffizienz führen). Eine zu geringe Annealing-Temperatur hingegen würde zu unspezifischen Bindungen und demnach zur Bildung von Nebenprodukten führen. Aus diesem Grund ist die Wahl der Annealing-Temperatur ein wichtiger Schritt bei der Etablierung neuer Primerpaare.

Durch die Schmelzanalyse im Anschluss an die Reaktion konnte die Entstehung unerwünschter Nebenprodukte und Primerdimere detektiert werden (Abbildung 11).

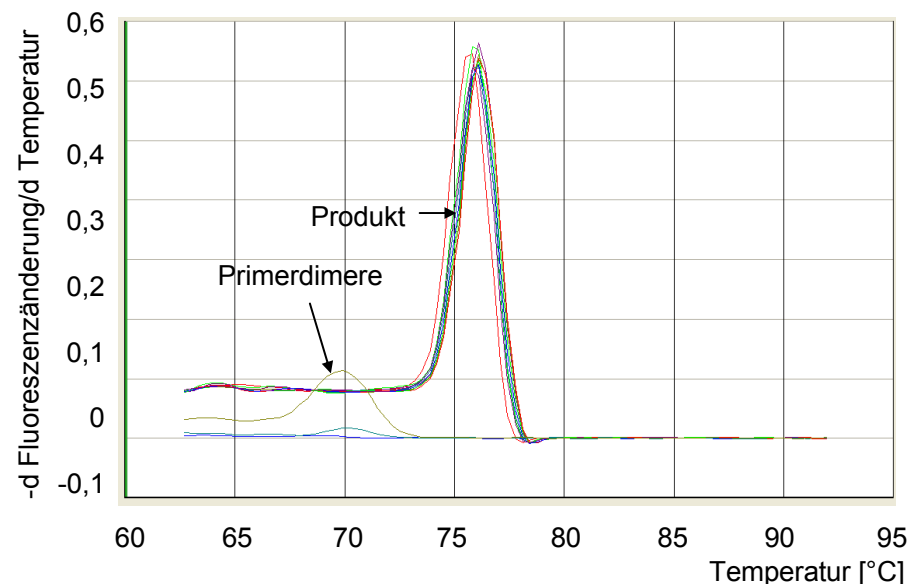


Abbildung 11: Schmelzkurve mit Primerdimer- und Produktbildung.

3.8.4.3 Bestimmung der Amplifikationseffizienz

Bei jedem PCR-Zyklus erfolgt im Idealfall eine Verdopplung der Amplikonmenge. Im Idealfall nimmt die Effizienz (E) den Wert 2 an (entspricht 100 %). Die reale Effizienz weicht im Normalfall jedoch von diesem Wert ab. Um verlässliche quantitative Aussagen bei der qPCR treffen zu können, müssen die realen Effizienzen für jedes Primerpaar bestimmt werden. Hierfür können verschiedene Verfahren angewendet werden. Eine der gängigsten Methoden ist die Verwendung einer Standardkurve.

Um eine Standardkurve anzufertigen, wurden mindestens zehn verschiedene cDNAs miteinander gemischt und folgende Verdünnungsstufen daraus hergestellt: unverdünnt, 1:2, 1:4; 1:8 und 1:16. Die cDNA-Verdünnungen wurden anschließend in der PCR amplifiziert und mit der *7500 Fast System SDS* Software analysiert. Die Software errechnete ein normalisiertes Reportersignal aus den Rohdaten und stellte dieses in einem Diagramm gegen die Anzahl der Zyklen dar (Abbildung 12A).

Innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikationsreaktion wurde anschließend ein Schwellenwert festgelegt. Dieser Wert wurde bei späteren PCR-Amplifikationen mit einem Primerpaar stets konstant gehalten. Die Zyklenzahl, an der die Amplifikationskurve den Schwellenwert schneidet, ist der Quantifizierungszyklus (Cq). Der Cq wurde in einem weiteren Diagramm gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Konzentration dargestellt (Abbildung 12B).

Die Gleichung der Regressionsgeraden wurde bestimmt und aus dem Anstieg der Geraden wurde die Amplifikationseffizienz ermittelt (Formel 2).

$$E = 10^{-\frac{1}{\text{Anstieg}}}$$

(Formel 2)

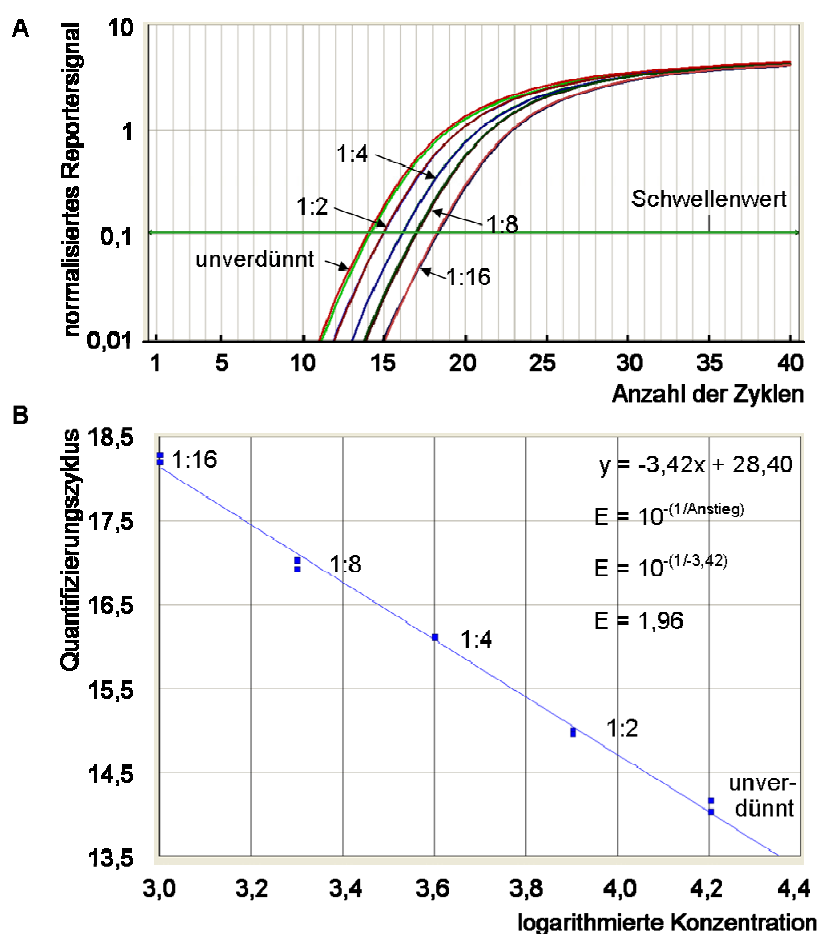


Abbildung 12: Bestimmung der PCR-Effizienz. Verschiedene Verdünnungen einer cDNA-Mischung wurden amplifiziert und das normalisierte Reportersignal gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen (A). Der Schnittpunkt der Kurven mit dem Schwellenwert ergibt die Quantifizierungszyklen. Diese wurden gegen die logarithmierte Konzentration der cDNA aufgetragen (B). Aus dem Anstieg der Regressionsgeraden konnte schließlich die Effizienz bestimmt werden.

Die über Standardkurven ermittelten PCR-Effizienzen und Schwellenwerte für die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: PCR-Effizienzen und Schwellenwerte

Gen	E	Schwellenwert	Gen	E	Schwellenwert
GAPDH	1,96	0,065	COL1A2	1,96	0,104
HPRT I	1,88	0,216	COL2A1	1,94	0,376
UBC	2,00	0,2145	COL10A1	1,96	0,160
YWHAZ	1,89	0,055	HAS2	n.b.	0,354
ACTB	n.b.	0,100	HAS3	n.b.	0,113
ACAN	1,98	0,045	MIA	1,91	0,065
ALPL	1,95	0,017	Sox-9	2,00	0,210

n.b. = nicht bestimmt (bei Berechnungen wurde der Idealwert 2 angewendet)

3.8.4.4 Bestimmung eines geeigneten Referenzgens

Bei der relativen Quantifizierung von Genexpressionsdaten werden die Markergenexpressionen auf eine Referenzgenexpression normiert. Eine Voraussetzung für die Wahl des Referenzgens ist, dass dieses nicht durch die gegebenen Kulturbedingungen auf mRNA-Ebene reguliert wird. In dieser Arbeit sollten Monolayer-, Mikromasse- und Hydrogelkulturen miteinander verglichen werden. Diese wurden sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen kultiviert. Es wurden undifferenzierte MSCs mit chondrogen differenzierten Kulturen und die Markergenexpression von MSCs mit der von Chondrozyten verglichen.

Für all diese unterschiedlichen Bedingungen wurden folgende Referenzgene auf ihre Eignung getestet: HPRT I, YWHAZ, GAPDH, ACTB und UBC (Primersequenzen siehe Tabelle 1 in Abschnitt 3.8.4.1). Die Software *geNorm* (<http://medgen.ugent.be/genorm>) wurde zur Ermittlung der zwei stabilsten Referenzgene je Bedingung herangezogen [128]. Für jedes Kontrollgen wurde hier durch die Software die paarweise Variation zu allen anderen Kontrollgenen als Standardabweichung der logarithmisch transformierten Expressionsverhältnisse ermittelt. Das Genpaar mit der geringsten Abweichung ist das am stabilsten exprimierte. In Tabelle 3 sind die zwei stabilsten Referenzgene für die oben genannten unterschiedlichen Zellkulturen dargestellt.

Tabelle 3: Referenzgenbestimmung durch *geNorm* bei verschiedenen Kulturbedingungen

Vergleich der mRNA-Expressionsdaten zwischen		ermittelte Referenzgene		Probenanzahl
undifferenzierten MSCs	Mikromassekulturen	HPRT I	GAPDH	12
undifferenzierten MSCs	Hydrogelkulturen	YWHAZ	HPRT I	12
undifferenzierten MSCs	Chondrozyten	YWHAZ	GAPDH	12
chondrogen differenzierten MSCs	Chondrozyten	YWHAZ	GAPDH	30
Mikromassekulturen	Hydrogelkulturen	YWHAZ	GAPDH	14
normoxisch kultivierten MSCs	hypoxisch kultivierten MSCs	YWHAZ	GAPDH	14

Die Gene, die am stabilsten unter den getesteten Kulturbedingungen exprimiert werden, sind GAPDH und YWHAZ. Da der Vergleich zwischen undifferenzierten MSCs und Hydrogelen in dieser Arbeit bedeutungsvoller ist als der Vergleich zwischen undifferenzierten MSCs und Mikromassen, wurde als Referenzgen YWHAZ und nicht GAPDH herangezogen (YWHAZ stellt das drittbeste Referenzgen der 5 getesteten beim Vergleich von undifferenzierten MSCs und Mikromassekulturen dar). Unter allen getesteten Bedingungen ist ACTB das am wenigsten stabile Gen und somit als Referenzgen am wenigsten geeignet.

3.8.4.5 Relative Quantifizierung der Markergenexpression durch Normierung auf das Referenzgen YWHAZ

Bei der Berechnung der Markergenexpression wurde die Effizienz der Amplifikation berücksichtigt (siehe Abschnitt 3.8.4.3). Die Expression relativ zum Referenzgen YWHAZ wurde durch folgende Gleichung bestimmt:

$$\text{relative Markergenexpression} = \frac{E^{Cq(\text{YWHAZ})}}{E^{Cq(\text{Markergen})}}$$

(Formel 3)

Bei Expressionsanalysen der Kollagen Typen II und X konnte teilweise keine mRNA-Expression detektiert werden. In diesen Fällen wurde die relative Markergenexpression als 10^{-7} definiert, um diese in Diagrammen darstellen zu können bzw. Veränderungen nach der chondrogenen Differenzierung als Zahlenwerte erfassen zu können.

Expressionsänderungen wurden als x-fache Änderungen angegeben. Hierbei wurde folgende Gleichung herangezogen:

$$x\text{-fache Änderung} = \frac{\text{relative Markergenexpression der veränderten Kultur}}{\text{relative Markergenexpression der Kontrollkultur}}$$

(Formel 4)

Expressionsänderungen von weniger als dem 2-fachen wurden als unverändert definiert.

3.9 Histologische Färbungen

3.9.1 Anfertigen von Gefrierschnitten

Um die Ablagerung von Extrazellulärmatrix auf Proteinebene zu zeigen, wurden histologische Untersuchungen an Gefrierschnittpräparaten durchgeführt. Hydrogel- und Mikromassekulturen wurden hierfür mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min (für Mikromassekulturen) bis 3 Stunden (für Hydrogele) in *Tissue-Tek O.C.T.* Einbettmedium inkubiert. Danach wurden die eingebetteten Proben im Kryostat bei -20 °C gefroren (Kammertemperatur: -25 °C) oder bis zum Schneiden bei -20 °C gelagert. Die Schnittdicke betrug für Sphäroide $10\text{ }\mu\text{m}$, für Hydrogele $50\text{ }\mu\text{m}$. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgenommen, bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

3.9.2 Selektive Alcianblaufärbung

Durch Alcianblau können saure Mukosubstanzen (Glykosaminoglykane) angefärbt werden. Gelatine-Hydrogele zeigen auch ohne Zellbesiedlung mit Alcianblau (nach dem Standardprotokoll) eine positive Färbung, weshalb die Selektivität der Färbung erhöht werden musste. Dies konnte durch eine Erhöhung des pH-Werts auf 5,8 und eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 0,8 M erreicht werden [132]. Die Alcianblaufärbung nutzt die unterschiedlichen kritischen Elektrolytkonzentrationen aus, welche die Komplexe aus Farbstoff und Polyanion (Glykosaminoglykan) besitzen. Die kritische Elektrolytkonzentration bestimmt die Löslichkeit des Komplexes und erhöht sich mit der Zahl der Sulfatgruppen am Polysaccharid. Durch eine Erhöhung der Magnesiumkonzentration werden nur die Substanzen gefärbt, welche mehrere Sulfatgruppen besitzen (vor allem Keratansulfat). Für die Färbung wurde von der *Biological Stain Commission* zertifiziertes Alcianblau 8GX (speziell für Anwendungen von Scott's pH 5,7 Methode) verwendet. Die Färbelösung wurde vor der Verwendung frisch hergestellt (siehe Abschnitt 2.8.1). Die Kryoschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Reinstwasser gewaschen, getrocknet, mit *Neo-Mount* Eindeckmedium eingedeckt und mikroskopisch im Hellfeld untersucht (Mikroskop *Axiophot* mit Farbkamera *AxioCam MRc5*, Zeiss).

3.9.3 Immunhistologische Färbungen

In der Immunhistologie wird die Antikörper-Antigenreaktion zur Visualisierung molekularer Strukturen ausgenutzt. Die zu färbenden und unfixierten Kryoschnitte wurden für 30 min mit 5 % Ziegennormalserum in PBS inkubiert um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers zu blocken. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht mit dem Erstantikörper bei 4 °C inkubiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Erstantikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Erstantikörper für immunhistologische Färbungen

Antigen	Klon	Firma	Verdünnung in PBS bzw. Konzentration
Aggrekan	SM1353	Acris Antibodies	1:40
Kollagen Typ I	I-8H5	MP Biomedicals	10 µg/ml
Kollagen Typ II	II-4CII	MP Biomedicals	10 µg/ml
Kollagen Typ X	X53K	Klaus von der Mark, Erlangen	5 µg/ml

Die Objektträger wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 90 min mit 7,5 µg/ml Zweitantikörper (*Cy3 conjugated AffiniPue Goat Anti-Mouse IgG+M*; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.; 115-165-044) inkubiert. Dieser und alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt, da der Zweitantikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3

gekoppelt ist. Die Schnitte wurden für eine Zellkernfärbung anschließend für 1 min mit DAPI (0,5 µg/ml) inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und Salze durch Waschen mit Reinstwasser entfernt. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden diese mit *Neo-Mount* Eindeckmedium eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

3.10 Quantifizierung sulfatierter Glykosaminoglykane (sGAG)

Eine Möglichkeit die Extrazellulärmatrixsynthese zu quantifizieren ist die Bestimmung des Gehaltes an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG). Es kann sowohl der abgelagerte sGAG-Gehalt als auch der ins Medium abgegebene Gehalt bestimmt werden.

Für die Bestimmung des Gehalts an sGAG in Mikromassen wurden diese zuvor mit Papain verdaut. Der Verdau wurde mit 200 µl Papainlösung pro Mikromasse über Nacht bei 60 °C durchgeführt. Für die Bestimmung des sGAG-Gehalts in Gelatinegelen (ohne Hyaluronan) wurden diese mit Collagenase B verdaut (siehe Abschnitt 3.8.1).

Für den Assay wurden 20 µl der verdauten Proben in einer Doppelbestimmung in die Kavitäten einer 96 well-Platte pipettiert. Bei den Mikromassen wurde eine 1:5 Verdünnung der verdauten Probe verwendet. Ebenso wurden je 20 µl einer Chondroitinsulfat-Standardreihe in Doppelbestimmung in die Kavitäten pipettiert. Für diese Standardreihe wurden 0, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80 und 100 µg/ml Chondroitinsulfat verwendet. Der Standard wurde für die Mikromassemessung in Papainpuffer und für die Gelatinegelmessung in verdautem Leergel angesetzt. Auf die Proben bzw. den Standard wurden mit einer Mehrkanalpipette je 260 µl der DMB-Lösung gegeben und die Absorptionen maximal 15 Sekunden nach Zugabe bei 520 nm am Multiplattenlesegerät gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein Schütteln der Platte vermieden wurde, da die Farbkomplexe sehr schnell unlösliche Aggregate bilden, welche die Messergebnisse verfälschen. Die Menge an abgelagertem sGAG pro Mikromasse bzw. pro Hydrogel mit 0,4 Millionen ursprünglich eingesetzten MSCs wurde ermittelt und dargestellt.

Die Bestimmung der sGAG-Menge im Medienüberstand (Abschnitt 4.1) erfolgte im Labor Tuan durch mit dem *Blyscan Glycosaminoglycan Assay-Fertigset*. Hierfür wurden in einem 2 ml-Reaktionsgefäß je 500 µl Medienüberstand mit je 1,5 ml Farbreagenz versetzt und eine Stunde lang geschüttelt. Anschließend wurde das Gefäß 30 min bei 16000 x g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und das Reaktionsgefäß getrocknet. Das ausgefällte sGAG wurde in 1 ml Dissoziationspuffer aufgenommen und eine Stunde geschüttelt. Je 200 µl der Lösung wurden in die Kavität einer 96 well-Platte überführt und bei 656 nm am Multiplattenlesegerät gemessen. Mit dem mitgelieferten Chondroitinsulfat wurde eine Standardreihe im Bereich von 0 bis 5 µg in Medium angesetzt, welche identisch zu den Proben behandelt wurde. Die Menge des ins Medium abgegebenen sGAGs pro ml Medienüberstand wurde ermittelt und dargestellt.

3.11 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit der Software *StatView* (*SAS Institute Inc.*) durchgeführt. p-Werte wurden mittels t-Test bestimmt, wenn normal verteilte Gruppen mit gleichen Varianzen verglichen wurden. Bei nicht normal verteilten Gruppen wurde der Mann-Whitney Rangsummentest angewendet. Für multiple Vergleiche wurde die Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Bonferroni-Test durchgeführt. Hierfür wurden die Daten zuvor logarithmiert um eine Normalverteilung der Datensätze zu gewährleisten.

Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt (★ $p < 0,05$; ★★ $p < 0,01$; ★★★ $p < 0,001$).

4 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde die chondrogene Differenzierbarkeit humaner mesenchymaler stromaler Vorläuferzellen (MSCs) aus dem Knochenmark in Gelatine-basierten Hydrogelen untersucht. Dabei wurden die Protokolle der MSC-Isolierung, -Expansion und -Differenzierung zur Verbesserung der Chondrogenese verändert. Zusätzlich wurden die Differenzierungsprotokolle hin zu klinisch anwendbaren Protokollen geändert, um zu ermöglichen, dass die Zell-Hydrogel-Konstrukte später bei der Bandscheibenregeneration angewendet werden können.

4.1 Einfluss von MSC-Isolierungs- und Expansionsprotokollen auf die chondrogene Differenzierung

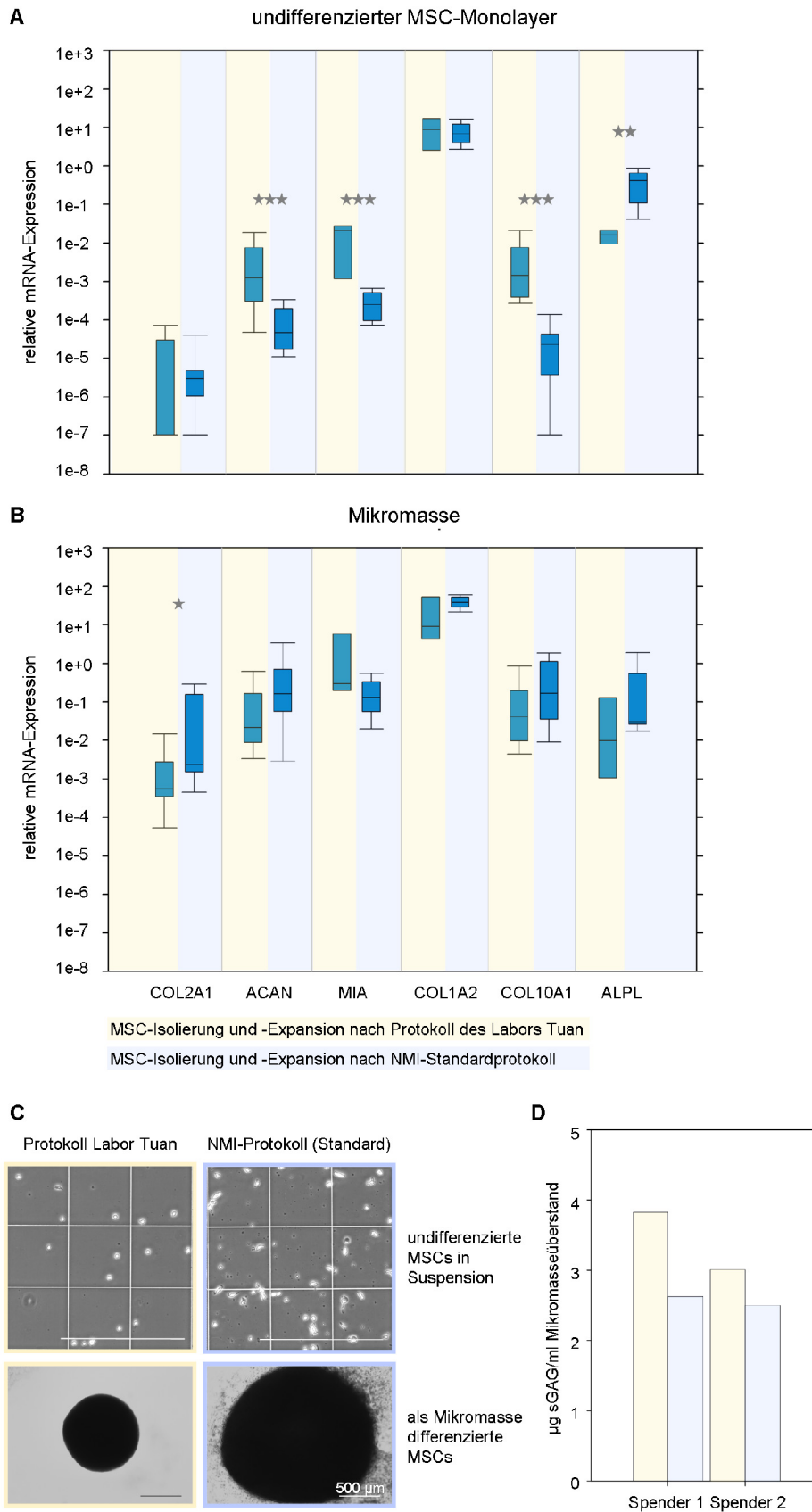
Für die Isolierung und auch die Expansion von MSCs aus dem Knochenmark liegen keine einheitlichen, standardisierten Protokolle vor. So werden z. B. am NMI MSCs über eine Dichtegradientenzentrifugation von Knochenmarksaspiraten gewonnen. Diese Zellen werden anschließend mit MSC-Expansionsmedium, welches unter anderem PDGF-BB und EGF enthält, als Monolayerkultur expandiert. Abweichend hierzu sind die Verfahren, welche im Labor Tuan an der Universität Pittsburgh angewendet werden. In diesem Labor werden MSCs standardmäßig ohne vorherige Trennung der Zelltypen im Dichtegradienten gewonnen. Zusätzlich wird hier eine andere Zusammensetzung des Expansionsmediums, mit Zusatz des Wachstumsfaktors FGF-2, verwendet.

Um festzustellen, ob diese zwei unterschiedlichen Protokolle den Phänotyp der enthaltenen MSCs beeinflussen, wurden sowohl morphologische Vergleiche herangezogen, als auch die Expression und die Synthese von Extrazellulärmatrix vor bzw. nach der chondrogenen Differenzierung untersucht. Auffallend waren bereits morphologische Unterschiede der expandierten MSCs in Suspension, nachdem diese mittels Trypsin vom Zellkulturboden abgelöst worden waren (Abbildung 13C). MSCs, welche nach Protokoll des Labors Tuan isoliert und expandiert wurden, waren homogen in Größe und Form, während die mit dem Standardprotokoll des NMIs kultivierten MSCs unterschiedliche Größen und Zellformen zeigten. Auch das mRNA-Expressionsprofil, welches mittels RT-qPCR erstellt wurde (siehe Abschnitt 3.8), zeigte Unterschiede im Expressionslevel von Chondrozytenmarkern (Abbildung 13A). Untersucht wurden die Kollagen Typen I, II und X, Aggrekan, MIA und Alkalische Phosphatase nach der MSC-Expansion. Die Expressionen wurden auf das Referenzgen YWHAZ normiert. Während sich die Expressionen der Kollagen Typen I (9 vs. 7) und II (1×10^{-7} vs. 3×10^{-6}) im Median nicht signifikant unterschieden, zeigten die anderen untersuchten Gene deutliche Unterschiede in den Expressionen.

MSCs, welche nach dem Protokoll des Labors Tuan isoliert und expandiert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Expression von Aggrekan (1×10^{-3} vs. 5×10^{-5}), MIA (2×10^{-2} vs. 3×10^{-4}) und Kollagen Typ X (1×10^{-3} vs. 2×10^{-5}) im Vergleich zu MSCs, welche nach NMI-Standardprotokoll erhalten und kultiviert wurden. Die Expression der Alkalischen Phosphatase hingegen war signifikant geringer (2×10^{-2}) als in den nach NMI-Protokoll isolierten und expandierten MSCs (4×10^{-1} im Median). Um zu überprüfen, ob sich auch in der chondrogenen Differenzierbarkeit Unterschiede zeigen, wurden die Zellen als Mikromassen für zwei Wochen chondrogen differenziert. Mikromassen sind Strukturen, welche aus MSCs aufgebaut sind, die hochdicht kultiviert werden. Die ersten chondrogenen Differenzierungen wurden erfolgreich in den 90er Jahren in Form solcher Zellpellets durchgeführt, weshalb diese auch heute noch als „Goldstandard“ für die chondrogene Differenzierung verwendet werden. Mikromassen, welche aus MSCs bestanden, die nach Protokoll des Labors Tuan isoliert und expandiert wurden, waren viel kleiner und kompakter als die NMI-Protokoll-Mikromassen (Abbildung 13C; insgesamt wurden zwei Spender direkt miteinander verglichen). Im Gegensatz zur Morphologie konnten im Expressionsprofil der Mikromassen kaum Unterschiede detektiert werden (Abbildung 13B). Lediglich die Expression von Kollagen Typ II war signifikant geringer (5×10^{-4} vs. 2×10^{-3}) in den Mikromassen mit MSCs vom Protokoll des Labors Tuan im Vergleich zu der der Mikromassen des NMI-Standardprotokolls. Die Expressionen von Aggrekan (2×10^{-2} vs. 2×10^{-1}), MIA (3×10^{-1} vs. 1×10^{-1}), der Kollagen Typen I (9 vs. 4×10^1) und X (4×10^{-2} vs. 2×10^1) und der Alkalischen Phosphatase (1×10^{-2} vs. 3×10^{-2}) waren nicht signifikant verschieden.

Von zwei Spendern wurden die MSCs parallel sowohl auf NMI-Art als auch auf Art des Labors Tuan isoliert und expandiert und die Sezernierung sulfatierter Glykosaminoglykane (sGAG) in das Medium nach vier Wochen chondrogener Differenzierung untersucht (Abbildung 13D). Im Medium beider Spender konnte mehr sGAG detektiert werden, wenn die MSCs nach dem Protokoll des Labors Tuan isoliert und expandiert wurden. Bei Spender 1 wurden $3,8 \mu\text{g/ml}$ und bei Spender 2 $3,0 \mu\text{g/ml}$ detektiert, während in den Überständen der NMI-Protokollproben $2,6 \mu\text{g/ml}$ bzw. $2,5 \mu\text{g/ml}$ detektiert wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass man durch das Verwenden unterschiedlicher MSC-Isolations- und -Expansionsprotokolle MSCs mit unterschiedlichem Phänotyp und Expressionsprofil erhält. Das Markergenexpressionsprofil nach der chondrogenen Differenzierung ist jedoch sehr ähnlich, unabhängig davon, welches Protokoll für die MSC-Isolierung und -Expansion verwendet wurde. Die Menge an abgelagertem sGAG ist hingegen, je nach verwendetem Protokoll, unterschiedlich.



(Abbildung 13)

Abbildung 13: Einfluss von MSC-Isolierung und -Expansion auf die Morphologie und die Synthese von Chondrozytenmarkern. (A) MSCs wurden nach dem Protokoll des Labors Tuan (Universität Pittsburgh) isoliert und expandiert (gelber Hintergrund) und die relative mRNA-Expression mittels RT-qPCR bestimmt und mit der mRNA-Expression von MSCs, welche nach NMI-Standardprotokoll isoliert und expandiert wurden (blauer Hintergrund), dargestellt. Signifikante Expressionsunterschiede konnten detektiert werden. (B) Die MSCs wurden anschließend als Mikromassen für zwei Wochen chondrogen differenziert und die Markergenexpression analysiert und dargestellt. Die Expressionsniveaus waren sehr ähnlich, unabhängig vom verwendeten MSC-Isolations- und -Expansionsprotokoll. 25/75 % Wertegrenzen wurden in Boxen und 10/90 % Wertegrenzen als Begrenzungslinien angegeben. Mediane wurden durch durchgezogene Linien gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen dargestellt (★ $p < 0,05$; ★★ $p < 0,01$; ★★★ $p < 0,001$; Mann-Whitney Rangsummentest). (C) Morphologisch ist auffallend, dass MSCs, die nach Labor Tuan-Protokoll isoliert und expandiert wurden, in Suspension sehr homogen in Form und Größe erschienen, während MSCs, welche nach Standardprotokoll isoliert und expandiert wurden, inhomogen erschienen. Nach Protokoll des Labors Tuan isolierte und expandierte MSCs bildeten kleinere und kompaktere Mikromassen als nach NMI-Standardprotokoll isolierte und expandierte MSCs (2 Spender insgesamt miteinander verglichen). (D) Nach vierwöchiger Differenzierung konnte im Medienüberstand zweier Spender mehr sGAG detektiert werden, wenn MSCs zuvor nach Labor Tuan-Protokoll isoliert und expandiert wurden.

4.2 Gelatinehydrogele als Zellträger

Das Standardmodell der chondrogenen Differenzierung, die Mikromassekultur, besteht aus hochdicht gepackten Zellaggregaten. Bei der Verfolgung des Ziels, MSCs für Bandscheibenregenerationen einzusetzen, sollten implantierte Zellen jedoch in geringer Zelldichte vorliegen, um der reduzierten Nährstoffversorgung im Gewebe entgegenzukommen. Da Mikromassen nicht in vitale Einzelzellen dissoziierbar sind, können diese somit nicht für die Therapie der Bandscheibe verwendet werden. In dieser Arbeit sollten deshalb MSCs in Hydrogelen kultiviert werden, welche ein Herauslösen vordifferenzierter Zellen erlauben. Solche Gele sind z. B. Gelatinegele, da diese enzymatisch verdaut und somit eingebettete Zellen daraus isoliert werden können. Das Gelatine-basierte Hydrogel hat zusätzlich den Vorteil, dass es als Transplantationsmatrix für eine Injektion von Zellen geeignet ist. Dies wird durch eine Reaktion mit Transglutaminase ermöglicht (Formel 1), wodurch die Bildung des Hydrogels *in situ* erfolgen kann. Die Zellen können dabei in die Hydrogele in kontrollierter Dichte eingebettet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 0,4 Millionen Zellen in 500 μ l Gellösung eingebettet, um eine möglichst ähnliche Zelldichte wie im nativen

Bandscheibengewebe zu erhalten. In Abbildung 14A sieht man die Größenunterschiede von Mikromasse und Hydrogel, mit jeweils 0,4 Millionen enthaltenen MSCs. Im Hydrogel waren die Zellen in einem wesentlich größeren Volumen verteilt als in der Mikromassekultur. Auch das Anfärben der Zellkerne in Kryoschnitten zeigte sehr deutlich die hochdichte Zellverteilung in den Mikromassekulturen (Abbildung 14B, linkes Bild). Im Gegensatz dazu waren Zelldichte und -verteilung in den Hydrogelen sehr ähnlich der des nativen humanen Nucleus pulposus der Bandscheibe (Abbildung 14B, Mitte und rechts).

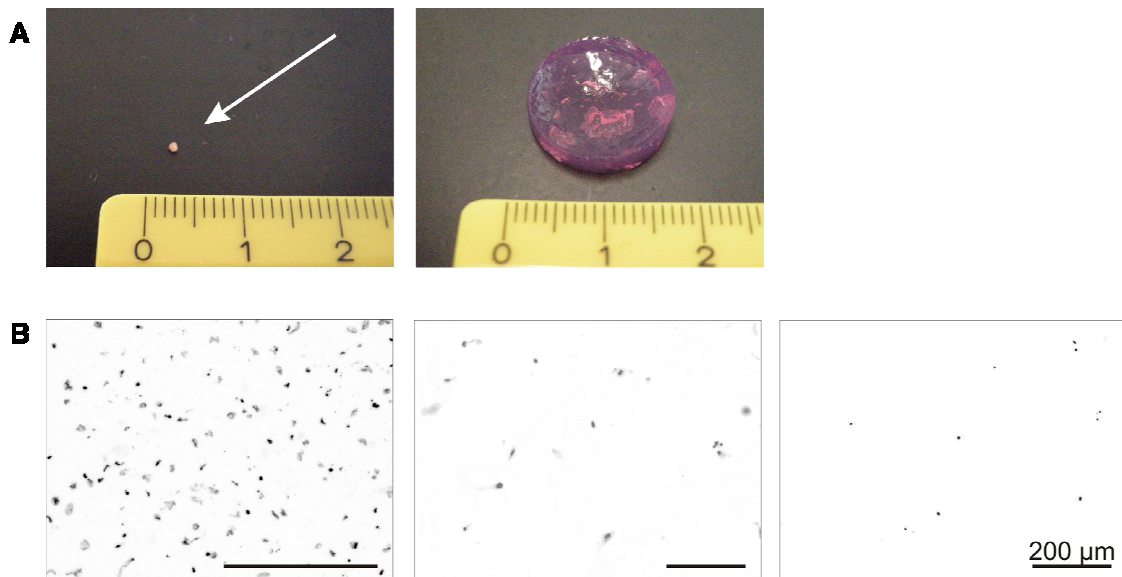


Abbildung 14: Größe und Zelldichte von Mikromasse- und Hydrogelkulturen. 0,4 Millionen MSCs wurden in Mikromassen als Hochdichtkulturen kultiviert (A, links), während in den Hydrogelen die gleiche Zellzahl in 500 µl Gel eingebettet wurde (B, rechts). Durch das Anfärben von Zellkernen in Kryoschnitten mittels DAPI (B) konnte die Zellverteilung im Mikromassepellet (links), im Hydrogel (Mitte) und im nativen Nucleus pulposus (rechts) dargestellt werden. Mikromassen zeigen eine hochdichte Verteilung von Zellen, während die Zellen in Hydrogelen ähnlich verteilt waren wie im nativen Gewebe. Fotos publiziert in *Cell Transplantation* [133].

Eine Voraussetzung für die Anwendung von Hydrogelen ist, dass genügend lebende MSCs auch nach mehreren Wochen in diesen vorzufinden sind. Durch Calcein-AM-Zugabe konnte auch nach 9 Wochen chondrogener Differenzierung in den Hydrogel-eingebetteten Zellen Calcein detektiert und die Viabilität der Zellen somit nach mehreren Wochen Kultivierungsdauer nachgewiesen werden (Abbildung 15A). Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in einem Gelatine-HA-Hydrogel zeigte, dass diese über eine Kultivierungsdauer von 10 Wochen hinweg konstant blieb (Abbildung 15B). Im Mittel konnten 107 ± 29 % der Anfangszellzahl über den gesamten Zeitraum detektiert werden.

Um zu überprüfen, wie lange tote Zellen in den Hydrogelen auffindbar sind, wurden mit Triton und Ethanol getötete Zellen in ein Gelatine-HA-Gel eingebettet und für 8 Wochen kultiviert. Auch nach dieser Zeit konnten noch 42 % der anfangs eingebetteten Zellen durch eine Färbung mit Propidiumiodid detektiert werden (Abbildung 15C). Im Gegensatz zu Monolayerkulturen kann aus diesem Grund bei den Gelatine-basierten Hydrogelen keine Aussage über die Zellvitalität zu einem bestimmten Zeitpunkt getroffen werden.

Für eine weitere Charakterisierung der *in vitro*-Eigenschaften der Gelatinegele wurde deren Stabilität während der Kultivierung untersucht. Hierfür wurden MSCs in Gelatine-HA-Gele eingebettet und mit Standarddifferenzierungsmedium, Standarddifferenzierungsmedium ohne TGF- β 3 und Dexamethason und mit Standard-MSC-Expansionsmedium kultiviert. Insgesamt wurden MSCs von zehn Spendern getestet. Die Gelstabilität wurde in 6 Stufen eingeteilt, wobei die Gelstabilität 1 einen vollständigen Abbau und die Stabilität 6 ein stabiles Gel bedeutete (siehe Abschnitt 3.5). Über 28 Tage hinweg waren die Gele in Kultur sehr stabil (Abbildung 16). Innerhalb der ersten zehn bis elf Tage konnten keine Veränderungen in der Stabilität wahrgenommen werden. Lediglich das Gel eines Spenders, welches mit Standarddifferenzierungsmedium ohne TGF- β 3 und Dexamethason kultiviert wurde, war etwas weicher als die anderen Gele (= Stabilität 5). Ab Kulturtag 24/25 wurde eine Gelstabilität von 5,4 bis 5,5 im Mittelwert beobachtet, welche mit Standarddifferenzierungsmedium bzw. mit Medium ohne TGF- β 3 und Dexamethason kultiviert wurden, während die Gele mit MSC-Expansionsmedium noch eine mittlere Stabilität von 5,9 zeigten.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich Gelatine-basierte Hydrogele dazu eignen, Zellen in kontrollierter Dichte einzubetten und diese über mehrere Wochen hinweg vital zu erhalten. Die Gelstabilität blieb darüber hinaus über mehrere Wochen erhalten.

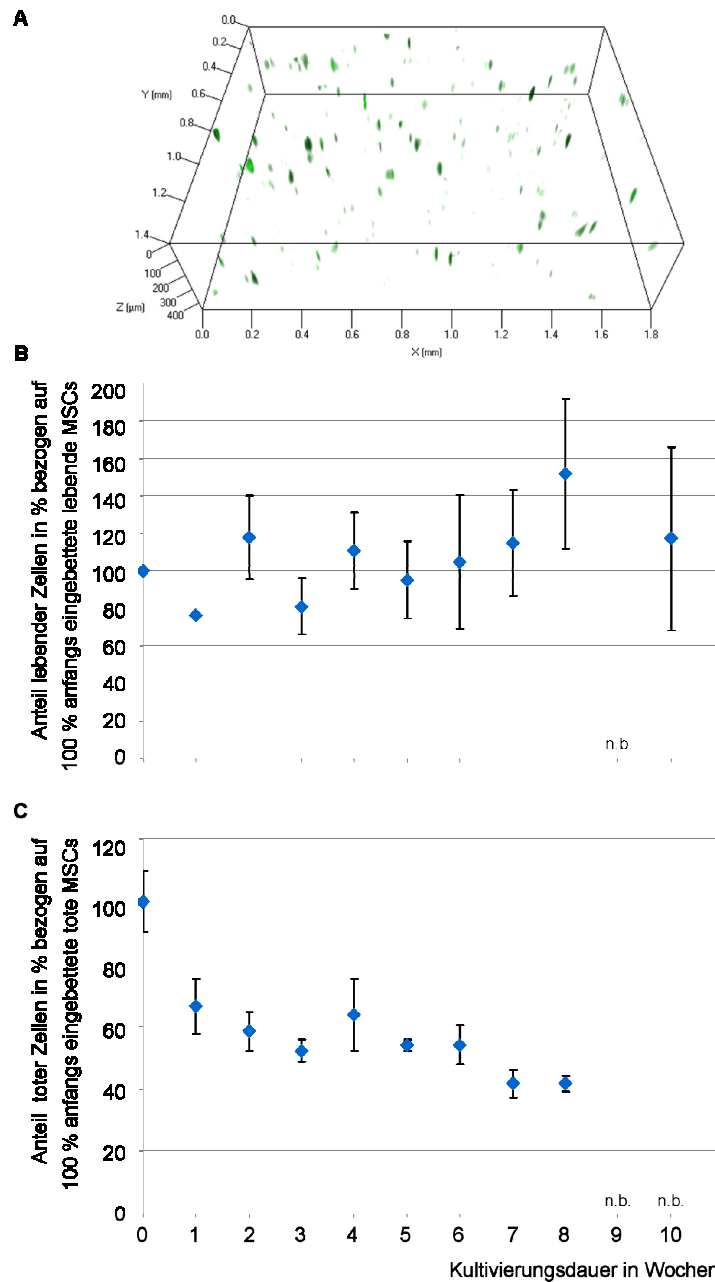


Abbildung 15: Viabilität von MSCs in Gelatine-HA-Hydrogelen. (A) Nach 9 Wochen chondrogener Differenzierung im Gelatine-HA-Gel wurden lebende Zellen durch Calcein angefärbt, am *ApoTome* aufgenommen und deren räumliche Verteilung dargestellt (publiziert in *Cell Transplantation* [133]) (B) Der Anteil lebender Zellen im Hydrogel in Prozent über einen Kultivierungszeitraum von 10 Wochen wurde grafisch dargestellt. Über diesen Zeitraum blieb die Lebendzellzahl konstant. (C) Für die Darstellung der Detektierbarkeit toter Zellen über eine Kultivierungsdauer von 8 Wochen hinweg wurden tote MSCs in ein Gel eingebettet. Jede Woche wurde der Anteil der noch im Gel vorhandenen toten Zellen durch die Zugabe von Propidiumiodid und Auszählen der Zellkerne bestimmt. Nach 8 Wochen waren noch 42 % der Zellen detektierbar. (n.b. = nicht bestimmt)

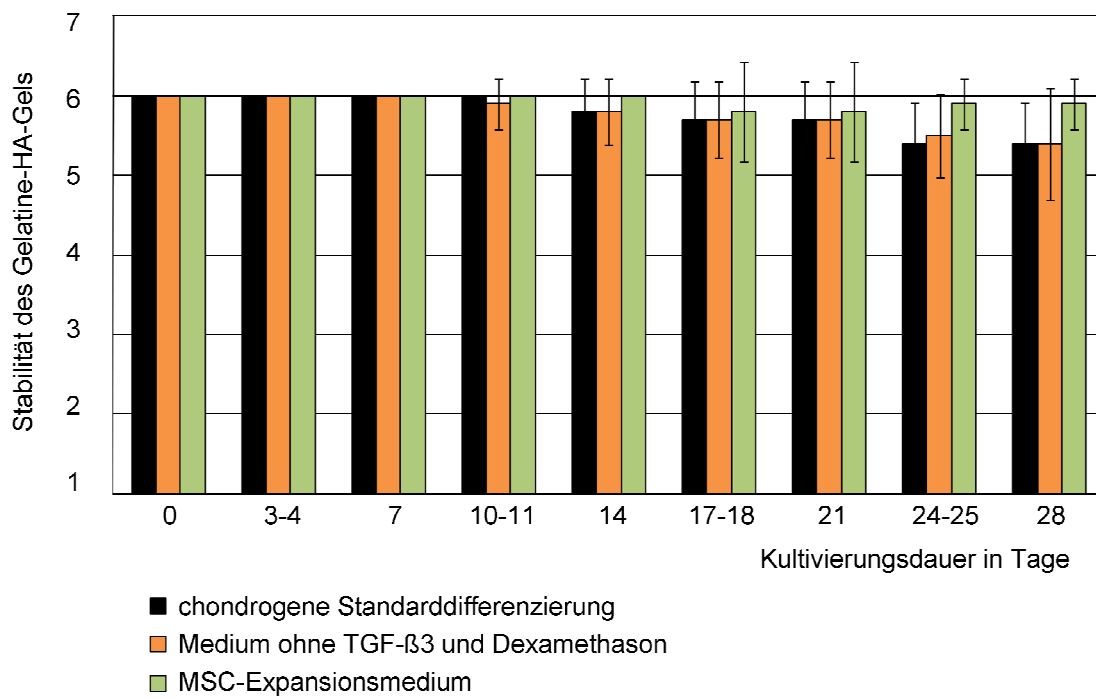


Abbildung 16: Stabilität der Gelatine-HA-Gele während der Kultivierung von MSCs. MSCs wurden in den Hydrogelen mit Standarddifferenzierungsmedium (schwarz), mit Standardmedium ohne TGF-β3 und Dexamethason (orange) oder mit MSC-Expansionsmedium (grün) kultiviert und die Gelstabilität visuell eingestuft (N = 10).

4.3 Chondrogene Differenzierung in Gelatine-basierten Hydrogelen

Um für die Regeneration der Bandscheibe verwendet werden zu können, sollten Hydrogele nicht nur injizierbar sein, ein Einstellen der Zelldichte erlauben und die Vitalität eingebetteter Zellen erhalten, sondern auch die Ausbildung eines funktionellen chondrozytären Phänotyps der Zellen unterstützen. Die Zellen müssen dazu fähig sein, in den Hydrogelen eine Matrix aufzubauen, welche vergleichbar mit der der nativen Bandscheibe ist. Um die Qualität der Matrixsynthese zu untersuchen, wurden RT-qPCR-Analysen von den Kollagen Typen I, II und X, von Aggrekan, MIA, Sox-9, HAS2 und 3 und der Alkalischen Phosphatase durchgeführt (Abbildung 17). Untersucht wurden die Expressionslevel undifferenzierter MSC-Monolayer und chondrogen differenzierter MSCs (als Mikromassen und eingebettet in Gelatine- und Gelatine-HA-Gele). Zusätzlich wurden die Expressionslevel kultivierter Chondrozyten aus hyalinem Knorpel sowie kultivierter Bandscheibenzellen bestimmt, um sowohl Expressionsunterschiede zwischen diesen Gewebezellen aufzuzeigen als auch die Expressionen mit denen der chondrogen differenzierten MSCs zu vergleichen.

Die Expressionswerte (Mediane) wurden in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: mediane mRNA-Expressionslevel

	MSC	MM	G	GH	HK	BS
Kollagen Typ II	5,9E-07	7,2E-03	1,0E-02	2,7E-04	4,2E-03	7,9E-05
Aggrecan	1,2E-04	3,3E-01	3,2E-01	5,8E-02	6,6E-01	1,8E-01
MIA	2,1E-04	1,1E-01	5,0E-01	1,0E-01	1,3E+00	1,9E-01
Sox-9	2,1E-03	4,1E-02	7,2E-02	6,2E-02	1,0E-01	3,7E-02
HAS2	1,4E-03	8,2E-03	2,2E-02	9,6E-03	2,1E-03	1,5E-03
HAS3	3,6E-05	8,8E-05	4,4E-04	6,3E-05	3,1E-04	6,5E-04
Kollagen Typ I	6,1E+00	2,9E+01	7,6E+01	3,7E+01	2,3E+00	6,8E+00
Kollagen Typ X	1,7E-05	4,9E-01	1,0E+00	1,3E-01	1,5E-04	1,0E-04
Alkalische Phosphatase	3,8E-01	1,7E-01	1,2E-01	1,3E-01	9,8E-03	6,1E-03

MSC	– undifferenzierter MSC-Monolayer	GH	– Gelatine-HA-Gel
MM	– Mikromasse	HK	– kultivierte Chondrozyten des hyalinen Knorpels
G	– Gelatinegel	BS	– kultivierte Bandscheibenzellen

Es waren sehr starke Expressionsschwankungen zwischen den einzelnen Spendern, vor allem bei Kollagen Typ II, Aggrecan, MIA und Kollagen Typ X, feststellbar. So waren teilweise Expressionsunterschiede von über 10^4 zwischen einzelnen Spendern detektierbar.

Durch eine chondrogene Differenzierung von MSCs für vier Wochen konnten signifikante Erhöhungen der Kollagen Typ II-, Aggrecan-, MIA-, Sox-9-, HAS2-, Kollagen Typ I- und Kollagen Typ X-mRNA-Expressionen detektiert werden. Kollagen Typ II-mRNA wurde im Median in den Mikromassen auf das 12209-fache, in den Gelatinegelen auf das 16975-fache und in den Gelatine-HA-Gelen auf das 451-fache, im Vergleich zum undifferenzierten Monolayer, erhöht exprimiert. Die Aggrecan-Expression wurde in den Mikromassen auf das 2682-fache, in den Gelatinegelen auf das 2562-fache und in den Gelatine-HA-Gelen auf das 470-fache erhöht. MIA-mRNA konnte im Median 516-fach in Mikromassen, 2356-fach in Gelatinegelen und 492-fach in Gelatine-HA-Gelen erhöht detektiert werden. Die Sox-9-Expression erhöhte sich 20-fach in Mikromassen, 34-fach in Gelatinegelen und 30-fach in Gelatine-HA-Gelen. HAS2-mRNA wurde in Mikromassen 6-fach, in Gelatinegelen 16-fach und in Gelatine-HA-Gelen 7-fach erhöht exprimiert. Nach der Differenzierung der MSCs wurde auch eine Erhöhung der Kollagen Typ I-Expression in Mikromassen (5-fach), in Gelatinegelen (12-fach) und in Gelatine-HA- Hydrogelen (6-fach) detektiert. Ebenso wurde Kollagen Typ X in

Mikromassen (28590-fach), in Gelatinegelen (60132-fach) und in Gelatine-HA-Gelen (7909-fach) erhöht exprimiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Expressionen von Alkalischer Phosphatase und HAS3 nach der chondrogenen Differenzierung detektiert werden. Bei keiner der getesteten Genexpressionen konnten signifikante Unterschiede innerhalb der chondrogen differenzierten MSC-Kulturen detektiert werden, egal ob diese als Mikromassen oder in Gelatine- oder Gelatine-HA-Hydrogelen differenziert wurden. Unabhängig vom verwendeten Kultursystem konnten die MSCs in allen Kulturumgebungen erfolgreich chondrogen differenziert werden.

Signifikante Unterschiede in den Genexpressionen konnten ebenfalls zwischen undifferenzierten MSCs und den kultivierten Zellen des hyalinen Knorpels und der Bandscheibenzellen detektiert werden. So waren die Expressionen von Kollagen Typ II im Median 7041- bzw. 134-fach, von Aggrecan 5314- bzw. 1487-fach, von MIA 6351- bzw. 905-fach, von Sox-9 49- bzw. 18-fach und von HAS3 8- bzw. 18-fach höher in den hyalinen Chondrozyten- bzw. Bandscheibenzellkulturen. Kollagen Typ X-mRNA konnte nur signifikant höher in den Chondrozytenkulturen des hyalinen Knorpels detektiert werden (9-fach). Die Kollagen Typ I-Expression war hingegen in den undifferenzierten MSC-Monolayern 3-fach höher als in den Chondrozytenkulturen des hyalinen Knorpels. Auch war die Expression der Alkalischen Phosphatase in undifferenzierten MSCs höher als in den hyalinen Chondrozyten- und Bandscheibenzellkulturen (39- und 63-fach). Die HAS2-Genexpression von undifferenzierten MSCs und den Knorpelgewebszellen war nicht signifikant verschieden.

Die kultivierten Knorpelgewebszellen unterschieden sich untereinander in der Expression von Kollagen Typ II, MIA, Sox-9 und Kollagen Typ I, während keine Unterschiede in den Aggrecan-, HAS2-, HAS3-, Kollagen Typ X- und Alkalische Phosphatase-Expressionen zu finden waren. Es befand sich mehr Kollagen Typ II-, MIA- und Sox-9-mRNA in den Chondrozytenkulturen des hyalinen Knorpels als in den Bandscheibenzellen (53-, 7 und 3-fach). In den Bandscheibenzellkulturen war hingegen 3-fach mehr Kollagen Typ I-mRNA zu finden. Bei der Präparation des Bandscheibengewebes konnte nicht eindeutig zwischen dem gallertartigen Nucleus pulposus und dem faserigen Anulus fibrosus unterschieden werden, wodurch bei den Expressionsuntersuchungen nur Mischkulturen der beiden recht unterschiedlichen Gewebetypen analysiert werden konnten. Zusätzliche Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten aber, dass die Genexpressionen der Zellen des Nucleus pulposus und des Anulus fibrosus direkt nach der Isolation aus der Bandscheibe sehr ähnlich sind (Daten nicht gezeigt). Insgesamt waren die Expressionen der Bandscheibenzellkulturen und der Chondrozytenkulturen des hyalinen Knorpels recht ähnlich.

Expressionsunterschiede zwischen differenzierten MSCs und Chondrozytenkulturen des hyalinen Knorpels konnten bei Aggrecan, MIA, HAS2, Kollagen Typ I, Kollagen Typ X und der Alkalischen Phosphatase detektiert werden. Die Aggrecan-Expression war in den Chondrozytenkulturen 11-fach höher als in Gelatine-HA-Gelen, während keine signifikanten Unterschiede zu den anderen differenzierten MSCs festgestellt werden konnten. Die MIA-

Expression war im Vergleich zu Mikromasse- und Gelatine-HA-Kulturen 12- bzw. 13-fach im Median erhöht. Umgekehrt waren 4-, 11- und 5-fach höhere HAS2-mRNA-Mengen in Mikromassen, Gelatine- und Gelatine-HA-Gelen zu detektieren. Auch die Expression für Kollagen Typ I und Kollagen Typ X war in den differenzierten MSC-Kulturen höher vorzufinden (12- bis 33-fach und 900 bis 6841-fach). In den Mikromassen und den Gelatine-HA-Gelkulturen war zudem die Expression der Alkalischen Phosphatase 18- und 14-fach höher als in den Chondrozytenkulturen. Zwischen differenzierten MSCs und hyalinen Chondrozytenkulturen konnten keine signifikanten Unterschiede in den Expressionen von Kollagen Typ II und HAS3 detektiert werden.

Auch zwischen chondrogen differenzierten MSCs und kultivierten Bandscheibenzellen konnten signifikante Expressionsunterschiede detektiert werden. So wurden Unterschiede in der Kollagen Typ II-, der HAS2-, HAS3-, Kollagen Typ I-, Kollagen Typ X- und der Alkalischen Phosphatase-Expression festgestellt. In den Mikromasse- und Gelatinegelkulturen wurden im Median 91- bzw. 127-fach mehr Kollagen Typ II exprimiert. Auch HAS2 wurde in den differenzierten MSC-Kulturen höher exprimiert (5- bis 14-fach). Die HAS3-Expression hingegen war in den Bandscheibenzellkulturen höher als in den Mikromasse- und Gelatine-HA-Gelkulturen (7- und 10-fach). mRNA von Kollagen Typ I und Kollagen Typ X war in den differenzierten Kulturen erhöht vorzufinden (4- bis 11- und 1340- bis 10186-fach). Die Alkalische Phosphatase wurde nur in Mikromassekulturen signifikant höher exprimiert (29-fach). In den Expressionsniveaus von Aggrekan, MIA und Sox-9 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen chondrogen differenzierten MSCs und kultivierten Bandscheibenzellen bestimmt werden.

Die Genexpressionsanalyse chondrogen differenzierter MSCs mittels RT-qPCR zeigte, dass chondrozytäre Markergene exprimiert wurden. Ob aber Matrixmoleküle auch von in Hydrogel eingebetteten MSCs gebildet und abgelagert werden, wurde mit immunhistologischen Färbungen überprüft. Es wurden Kryoschnitte von Gelatinegelen angefertigt, welche für neun Wochen chondrogen differenzierte MSCs enthielten, und die Ablagerung der Kollagen Typen I, II und X und von Aggrekan durch spezifische Antikörper dargestellt (Abbildung 18). Es konnte gezeigt werden, dass alle vier Matrixmoleküle von den eingebetteten Zellen produziert und in den Hydrogelen abgelagert wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, humane MSCs des Knochenmarks in geringer Zelldichte ohne Zell-Zell-Kontakt in Gelatinehydrogelen zu differenzieren. Die Zellen zeigten, unabhängig vom verwendeten Hydrogel, ein Expressionsprofil welches sehr ähnlich dem der Mikromassekulturen ist. Die Synthese und Ablagerung von Extrazellulärmatrix konnte ebenfalls nachgewiesen werden.

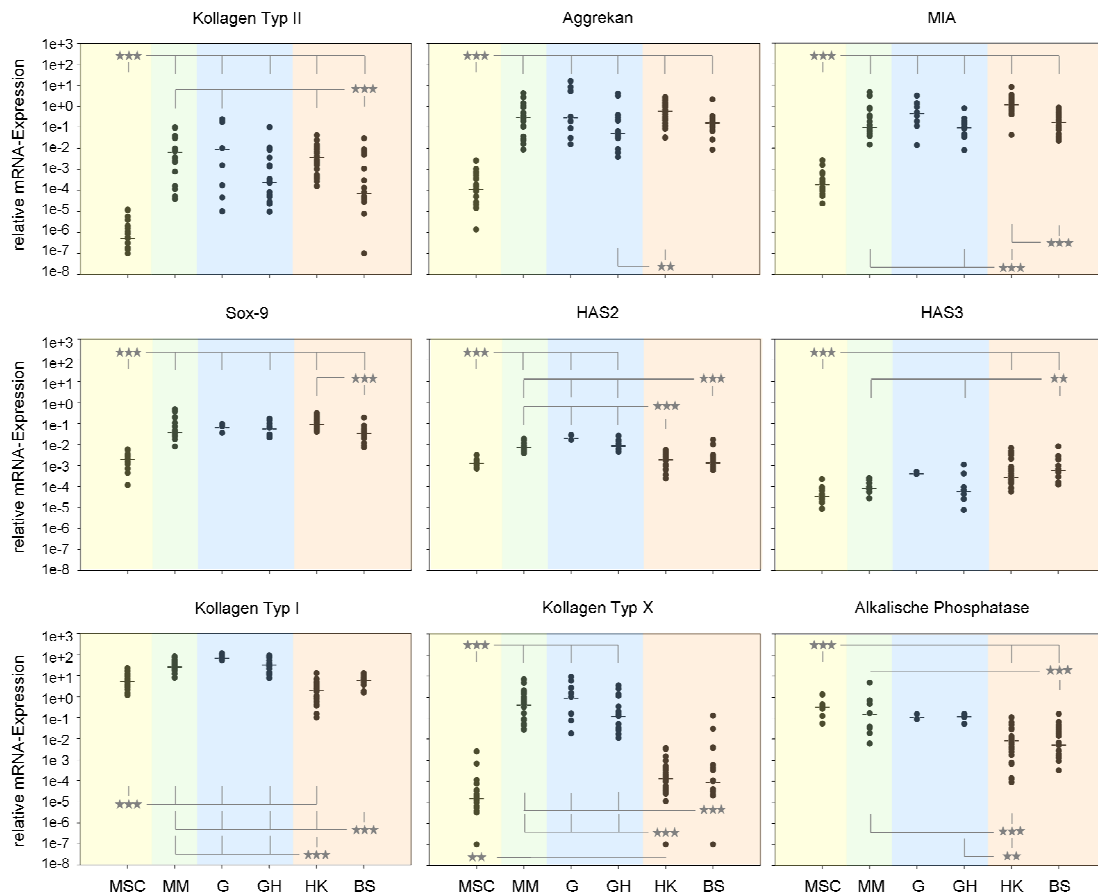


Abbildung 17: mRNA-Expression von MSCs, Chondrozyten des hyalinen Knorpels und von Bandscheibenzellen. Die Expressionen von Kollagen Typ II, Aggrekan, MIA, Sox-9, HAS2, HAS3, Kollagen Typ I, Kollagen Typ X und Alkalischer Phosphatase wurden auf das Referenzgen YWHAZ normiert. Die relativen Expressionen undifferenzierter MSCs (MSC, gelber Hintergrund), differenzierter MSCs (grüner und blauer Hintergrund), kultivierter Chondrozyten des hyalinen Knorpels (HK, roter Hintergrund) und kultivierter Bandscheibenzellen (BS, roter Hintergrund) von jedem Spender einzeln und die Mediane wurden dargestellt. MSCs wurden als Mikromassen (MM, grüner Hintergrund), und eingebettet in Gelatine- (G, blauer Hintergrund) und in Gelatine-HA-Hydrogele (GH, blauer Hintergrund) für 4 Wochen chondrogen differenziert. Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen den mRNA-Expressionsniveaus (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA-Bonferroni).

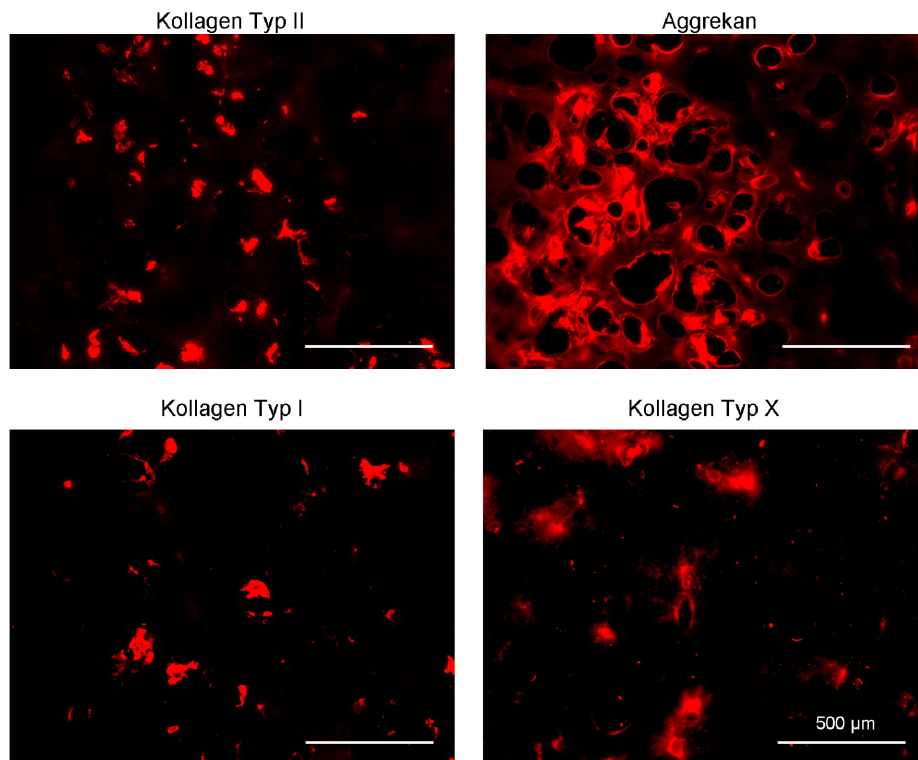


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von Gelatinegelen mit eingebetteten MSCs. Die Zellen wurden für 9 Wochen in den Gelen differenziert und die Ablagerung von Aggrekan und der Kollagen Typen I, II und X in 50 µm dicken Kryoschnitten mittels spezifischer Antikörper dargestellt.

4.4 Verbesserung der chondrogenen Differenzierung durch die Reduktion des Sauerstoffs

Neben der Veränderung der Medienzusammensetzung für die MSC-Expansion, wie es in Abschnitt 4.1 untersucht wurde, kann der Gehalt an Sauerstoff während der Kultivierung von MSCs verändert und eventuelle Effekte auf die chondrogene Differenzierbarkeit analysiert werden. Der Sauerstoffgehalt, welcher bei Standardkultivierungen auf die Zellkulturen wirkt, entspricht etwa dem der Atmosphäre (Beimischung von CO₂ [5 %]; 20 % Sauerstoff). Solch eine hohe Sauerstoffkonzentration ist unphysiologisch. Gerade in der avaskulären Bandscheibe herrschen hypoxische Bedingungen vor, welchen die dort vorhandenen Zellen ausgesetzt sind. Die Auswirkung eines reduzierten Sauerstoffgehalts auf MSCs wurden analysiert indem die Zellen sowohl unter Normalbedingungen (20 % O₂) als auch unter reduziertem Sauerstoffgehalt (4 % O₂ = Hypoxie) expandiert und/oder differenziert wurden.

Während der Differenzierung von MSCs als Mikromassen wurde deutlich, dass der Sauerstoffgehalt während der Kultivierung deren Größe beeinflusste (Abbildung 19). Mikromassen, deren MSCs zuvor unter hypoxischen Bedingungen expandiert wurden, hatten signifikant größere Querschnittsflächen ($1,0 \text{ mm}^2$ im Median) als solche mit normoxisch expandierten MSCs ($0,8 \text{ mm}^2$ bzw. $0,7 \text{ mm}^2$). Unter den Mikromassen mit MSCs von sechs verschiedenen Spendern gab es zwei Ausreißer vom selben Spender, welche nach hypoxischer MSC-Expansion eine Fläche von mehr als $2,5 \text{ mm}^2$ zeigten. Auch nach Ausschluss dieser Ausreißer aus der statistischen Analyse konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden. Bei dem Vergleich von hypoxisch differenzierten mit normoxisch differenzierten Mikromassen waren keine signifikanten Unterschiede bei der Größenentwicklung beobachtbar.

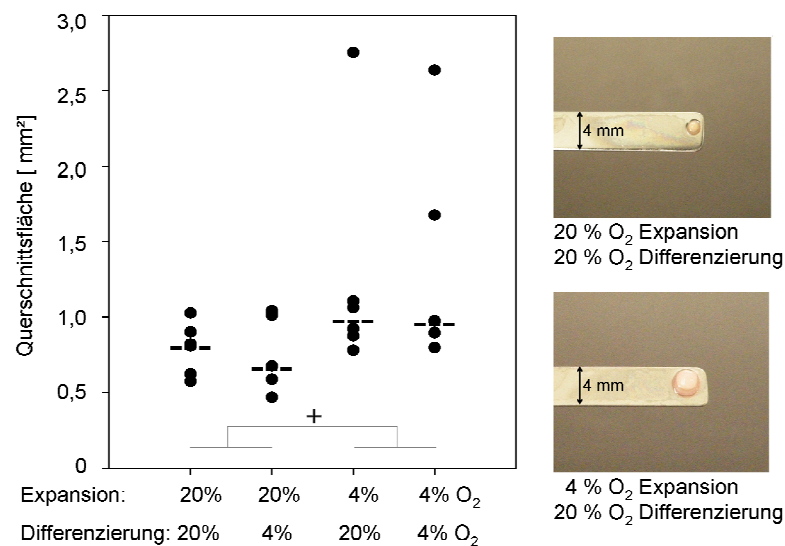


Abbildung 19: Flächeninhalt der Querschnitte von Mikromassen nach der Kultivierung der MSCs unter Hypoxie (4 % O₂) bzw. Normoxie (20 % O₂). MSCs wurden entweder hypoxisch oder normoxisch expandiert, bevor sie unter Hypoxie oder Normoxie als Mikromassen differenziert wurden. Nach zwei Wochen Differenzierung wurde unter dem Mikroskop die Größe der Mikromassen durch die Messung des Flächeninhalts der Mikromasseumrisse bestimmt. Die Größe der Mikromassen sechs verschiedener Spender und die Mediane sind dargestellt (+ p < 0,05; t-Test). Diagramm publiziert in *Cell Transplantation* [133].

Der Effekt der Reduzierung des Sauerstoffs bei der Kultivierung von MSCs in Hydrogelen wurde mittels RT-qPCR, sowie histologisch als auch durch sGAG-Quantifizierung untersucht. Die Markergenexpression wurde in Zellen analysiert, welche insgesamt für zwei und acht Wochen differenziert wurden. Da sich die mRNA-Expression nach zwei Wochen chondrogener

Differenzierung nicht mehr änderte, wurden die Ergebnisse der beiden Zeitpunkte nicht gesondert dargestellt. Die Genexpressionen der Kollagen Typen I (COL1A2), II (COL2A1) und X (COL10A1), von Aggrekan (ACAN), MIA und Sox-9 nach hypoxischer MSC Expansion und/oder Differenzierung wurde ermittelt und mit denen nach Standardkultivierung (20 % O₂ während der MSC-Expansion und Differenzierung) verglichen (Abbildung 20). Die Differenzierung von MSCs unter 4% Sauerstoff nach normoxischer Expansion führte zu einem signifikanten Anstieg von Kollagen Typ II, Aggrekan und MIA in beiden Hydrogelen (erste Box in den Diagrammen und erste Zeile der Tabelle von Abbildung 20). Eine Steigerung der Aggrekanexpression auf mehr als das 5-fache im Median konnte in beiden Hydrogelen detektiert werden. Die Expressionen von MIA und Kollagen Typ II stiegen, im Vergleich zu den Standard-Kulturbedingungen, in Gelatine-HA-Hydrogelen stärker an (> 5-fach) als in Gelatinegelen (> 3-fach). Darüber hinaus erhöhte sich die mRNA-Expression von Kollagen Typ X in Gelatine-HA-Hydrogelen signifikant (2,4-fach), während in den Gelatinehydrogelen keine Zunahme festgestellt werden konnte. Der Einfluss der reduzierten Sauerstoffbedingungen auf die Markergenexpression während der Differenzierung von Mikromassen war nicht so stark wie in den Hydrogelen, nur die Expressionen von MIA und Sox-9 wurden hier signifikant erhöht (im Median 5,2-fach bzw. 2,6-fach).

Die Expansion von MSCs unter hypoxischen Bedingungen verbesserte die chondrogene Differenzierung in Gelatinehydrogelen nicht, wenn die nachfolgende Differenzierung unter normoxischen Bedingungen erfolgte (zweite Box in den Diagrammen und zweiten Reihe der Tabelle von Abbildung 20). Nur die mRNA-Expression von Aggrekan wurde hier signifikant erhöht (im Median 2,1-fach). In Gelatine-HA-Hydrogele hingegen konnte eine erhöhte Expression von Kollagen Typ II (2,6-fach), Aggrekan (4,2-fach), MIA (3,0-fach) und Kollagen Typ X (3,3-fach) nachgewiesen werden. Die Effekte in Mikromassen waren ähnlich wie die in Gelatine-HA-Hydrogelen. Es konnte hier eine mediane Zunahme auf das 2,2-fache für die Kollagen Typ II-, das 8,2-fache für die Aggrekan-, das 4,0-fache für die MIA-, das 2,1-fache für die Sox-9- und das 2,9-fache für die Kollagen Typ X-Expression bestimmt werden. Die stärksten Effekte auf die Markergenexpressionen konnten detektiert werden, wenn der Sauerstoffgehalt während der gesamten Kultivierungsdauer, sowohl während der Expansion als auch während der Differenzierung der MSCs, verringert wurde. Dies war sowohl für Mikromasse- als auch für Hydrogelkulturen feststellbar (dritte Box in den Diagrammen und dritte Reihe der Tabelle von Abbildung 20). Auf diese Weise kultivierte MSCs, welche in Gelatinegele eingebettet wurden, produzierten im Median mehr als fünfmal so viel Kollagen Typ II-, etwa 20-mal so viel Aggrekan- (24,2-fach) und MIA- (19,6-fach) und mehr als dreimal so viel Kollagen Typ X-mRNA wie unter Standardbedingungen. Ein noch stärkerer Effekt konnte sogar für Gelatine-HA-Hydrogele festgestellt werden. Hier wurde mehr als 10-mal so viel Kollagen Typ II- (16,9-fach), Aggrekan- (17,3-fach), MIA- (21,6-fach) und Kollagen Typ X-mRNA (10,3-fach) detektiert als nach normoxischer Kultivierung. In den Mikromassekulturen wurde die mRNA-Expression von Kollagen Typ II und Aggrekan auf mehr als das 10-fache

(31,7-fach und 11,6-fach), von MIA und Kollagen Typ X auf mehr als 9-fache, und Sox-9 auf mehr als das 3-fache im Median gesteigert.

Die Expression von Kollagen Typ I wurde durch die Änderung der Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung nicht beeinflusst, weder in den Mikromassen noch in den Hydrogelen. Die Menge an Sox-9 blieb in den Hydrogelen unabhängig vom Sauerstoffgehalt ebenfalls konstant.

Zur Unterstützung der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurde zusätzlich die Synthese von Keratansulfat untersucht. Abgelagertes Keratansulfat wurde durch eine selektive Alcianblaufärbung angefärbt. Es konnte eine homogene Ablagerung sowohl in Mikromassen als auch in Gelatinehydrogelen in allen Kulturen beobachtet werden, unabhängig von den während der Kultivierung eingesetzten Sauerstoffbedingungen (Abbildung 21A). In den Gelatinegelen wurden die Zellen in sehr geringer Dichte eingebettet (siehe Abbildung 14B), so dass die Färbung hier weniger intensiv war als in den Mikromassen. Um zu überprüfen, ob die Synthese von Matrixmolekülen durch die Sauerstoffkonzentration während der Kultivierung beeinflusst wird, wurde die Menge an abgelagertem sulfatierten GAG in Gelatinehydrogelen und in Mikromassen nach acht Wochen Differenzierung von MSCs für drei Spender bestimmt (Abbildung 21B). Zwischen den Spendern konnten starke Unterschiede in der sGAG-Menge detektiert werden. So lagen die Messwerte teilweise unter der Nachweisgrenze, während andererseits mehr als 100 µg sGAG pro Gelatinehydrogel (mit 0,4 Millionen eingebetteten MSCs) detektiert werden konnte. Bei allen drei Spendern konnte aber ein Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die sGAG-Synthese bestimmt werden. Bei zwei der drei Spender konnte kein sGAG (unter 7 µg) in den Gelatinegelen detektiert werden, wenn MSCs normoxisch expandiert wurden. Eine hypoxische Expansion der MSCs erhöhte hingegen die sGAG-Ablagerung auf 11 µg bei einem Spender und auf 7 und 21 µg bei dem zweiten Spender. In den Gelatinehydrogelen des dritten Spenders konnte durch die hypoxische MSC Expansion der sGAG-Gehalt um das 2,7- bis 3,7-fache erhöht werden. Die normoxische Expansion führte zu einer Ablagerung von 33 bzw. 42 µg sGAG, während nach hypoxischer Expansion ein Wert von 113 bzw. 122 µg sGAG pro Gelatinegel gemessen wurde, je nachdem ob die Differenzierung unter 20 % oder unter 4 % Sauerstoff durchgeführt wurde. Erhöhte sGAG-Depositionen konnten ebenfalls in den Mikromassekulturen des dritten Spenders detektiert werden. Diese enthielten nach normoxischer MSC-Expansion 15 bzw. 52 µg sGAG, während durch die Verringerung des Sauerstoffgehalts auf 4 % während der Expansionsphase erhöhte sGAG-Mengen von 187 bzw. 123 µg pro Mikromasse gemessen wurden.

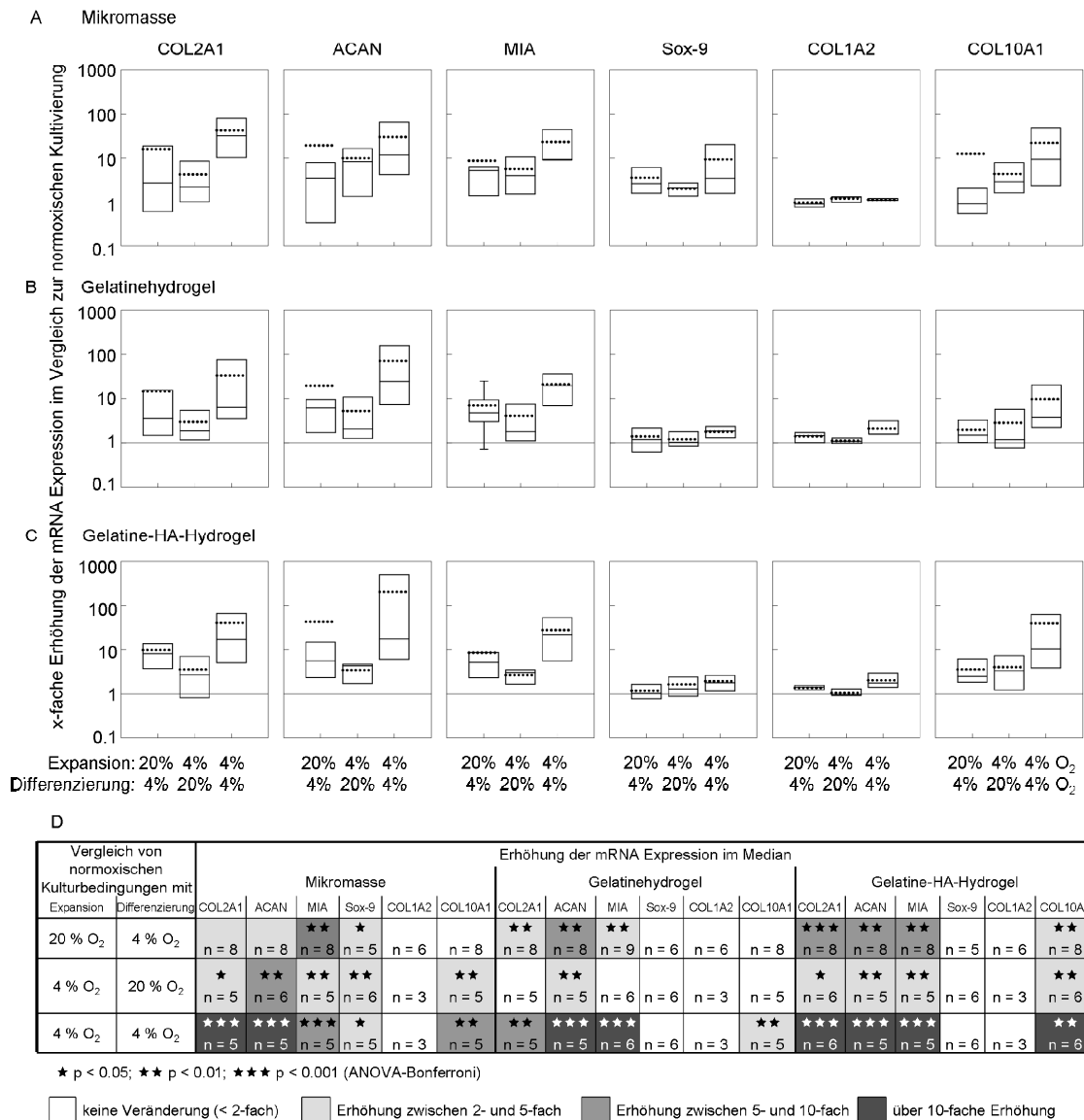


Abbildung 20: Effekt der Hypoxie auf die mRNA-Expression von Chondrozytenmarkern in differenzierten MSCs. Dargestellt wurde der Einfluss von 4 % Sauerstoff während der Expansion und/oder der Differenzierung als Mikromassen (A), in Gelatine- (B) und in Gelatine-HA-Gelen (C) im Vergleich zur Standarddifferenzierung bei 20 % Sauerstoff. Die x-fachen Expressionserhöhungen wurden in Boxen mit den 25/75 % Wertegrenzen angegeben. Begrenzungslinien geben die 10/90 % Wertegrenzen an. Mittelwerte wurden mit einer gestrichelten Linie dargestellt und Mediane mit durchgezogenen Linien. Signifikante Unterschiede und die Anzahl der getesteten Spender für jede Gruppe und jedes Gen sind in Tabelle D aufgeführt. Publiziert in *Cell Transplantation* [133].

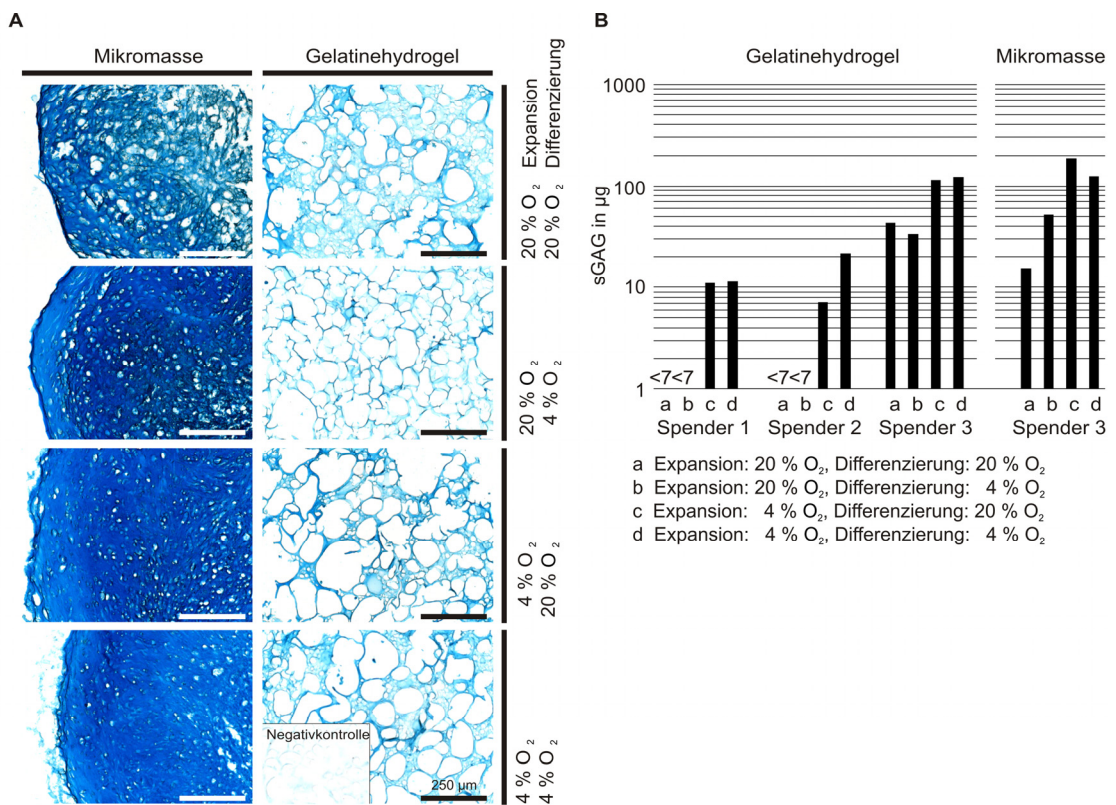


Abbildung 21: Ablagerung von Extrazellulärmatrix in Mikromassen und in Gelatinegelen nach der Differenzierung von MSCs für acht Wochen. Keratansulfate der Extrazellulärmatrix wurden mit Alcianblau angefärbt (A). Die Menge an abgelagerten sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) in µg pro 0,4 Millionen MSCs, welche anfangs zur Differenzierung eingesetzt wurden, wurde bei drei Spendern mittels 1,9-Dimethylmethylenblau bestimmt (B). Publiziert in *Cell Transplantation* [133].

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Verringerung des Sauerstoffgehaltes auf 4 % während der *in vitro* Kultivierung positiv auf den Verlauf der chondrogenen Differenzierung auswirkt. Die Auswirkungen während der MSC-Expansion waren dabei stärker als während der Differenzierung, unabhängig davon, ob MSCs in Hydrogelen oder als Mikromassen differenziert wurden.

4.5 Anpassung der Differenzierungsprotokolle für Anwendungen von MSCs in der Klinik

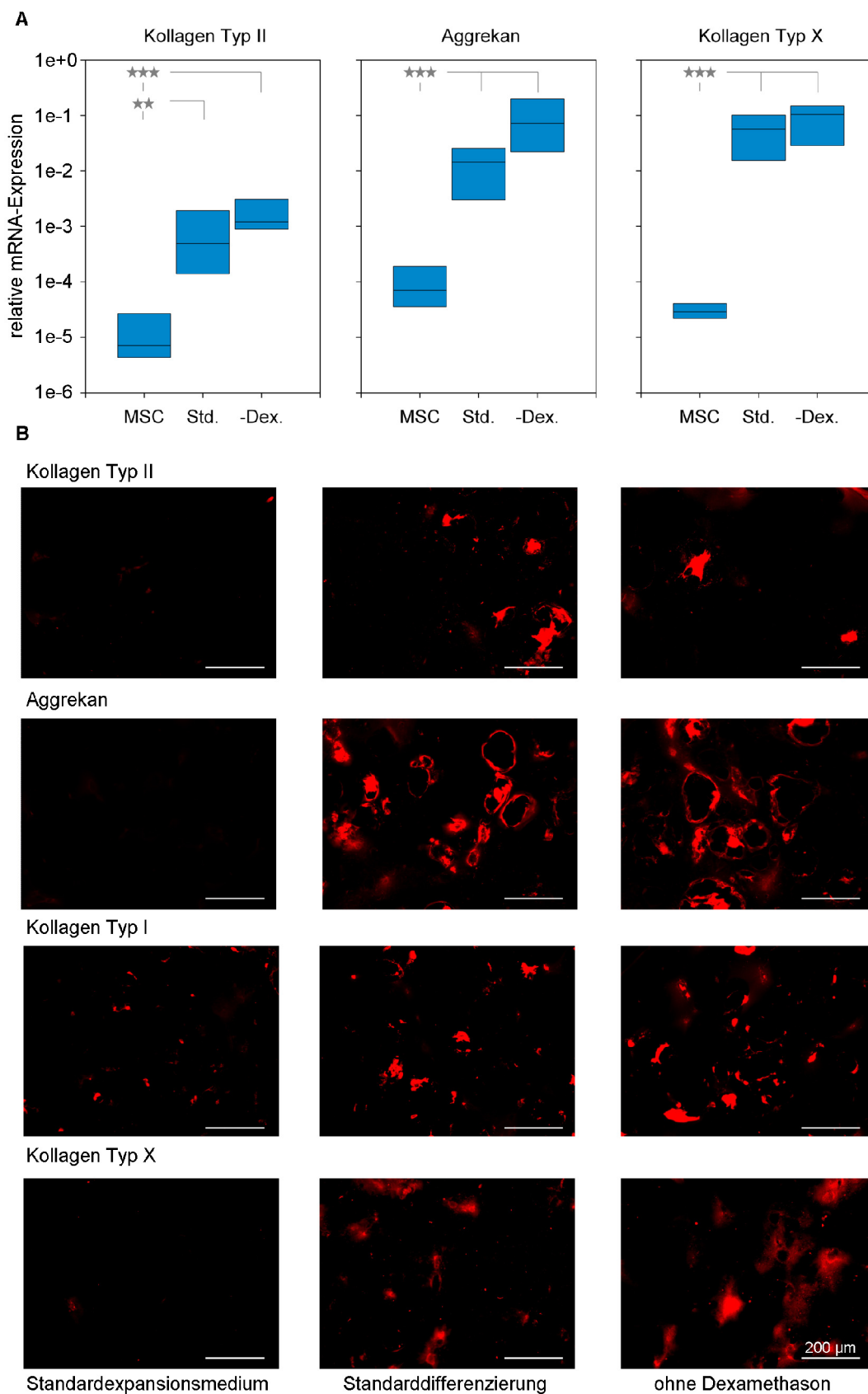
Die Protokolle, welche im Laboralltag entwickelt wurden, sind nicht dafür ausgelegt, MSCs klinisch einzusetzen. Aus diesem Grund müssen die Protokolle so verändert werden, dass eine Übertragbarkeit für klinische Anwendungen möglich ist. Jede zugesetzte Substanz muss für die Anwendung im Menschen GMP-konform hergestellt und die Unbedenklichkeit der Substanzen muss nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist es von Vorteil, wenn möglichst nur Substanzen verwendet werden, welche zum Erfolg der Therapie beitragen. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob der Zusatz von Dexamethason und TGF- β 3 zum Differenzierungsmedium für eine chondrogene Differenzierung notwendig ist.

4.5.1 Chondrogene Differenzierung ohne Dexamethason

Dexamethason ist ein Glukokortikoid, welches standardmäßig bei der chondrogenen Differenzierung von MSCs eingesetzt wird. Ob die Differenzierung ohne den Zusatz des Glukokortikoids beeinträchtigt wird, wurde im Verlauf dieser Arbeit untersucht.

MSCs sechs verschiedener Spender wurden hierfür in Gelatine-HA-Gele eingebettet und für vier Wochen sowohl mit als auch ohne Dexamethasonzusatz chondrogen differenziert und die mRNA-Expression von Kollagen Typ II, Aggrekan und Kollagen Typ X analysiert (Abbildung 22A). Die Expression der Gene wurde nach der Differenzierung mit beiden Medien signifikant erhöht, was eine erfolgreiche Differenzierung zeigte. Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den chondrogen differenzierten Kulturen detektiert werden, egal ob dem Medium Dexamethason zugesetzt wurde oder nicht. Die Expression der Kollagen Typen II und X wurde durch das Weglassen von Dexamethason im Median auf das 2-fache und von Aggrekan auf das 5-fache erhöht (nicht signifikant verschieden).

Die Ablagerung von Extrazellulärmatrixmolekülen wurde durch immunhistologische Färbungen und sGAG-Analysen nachgewiesen. Hierfür wurden MSCs in Gelatinegele eingebettet und für neun Wochen mit MSC-Expansionsmedium, mit Standarddifferenzierungsmedium und mit Differenzierungsmedium ohne Dexamethason kultiviert. Immunhistologische Färbungen der Kollagen Typen I, II und X und von Aggrekan zeigten, dass diese Extrazellulärmatrixmoleküle nach der Kultivierung mit beiden Differenzierungsmedien in den Gelen tatsächlich abgelagert wurden (Abbildung 22B). Die Kultivierung mit MSC-Expansionsmedium hingegen führte nicht zu einer nachweisbaren Synthese von Aggrekan. Kollagen Typ I konnte, verglichen mit den mit Differenzierungsmedium kultivierten Gelen, in geringerer Menge gefunden werden, die Kollagen Typen II und X waren nahezu nicht nachweisbar.



(Abbildung 22)

Abbildung 22: Chondrogene Differenzierung von MSCs in Gelatine-basierten Hydrogelen mit und ohne Zusatz von Dexamethason. (A) Die relative mRNA-Expression von Kollagen Typ II, Aggrekan und Kollagen Typ X undifferenzierter MSCs (MSC) und vier Wochen lang differenzierter MSCs in Gelatine-HA-Gelen wurden dargestellt. MSCs wurden mit chondrogenem Standardmedium (Std.) oder mit Medium ohne Dexamethason (-Dex) differenziert. Signifikante Expressionsunterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA-Bonferroni). (B) Die Ablagerungen von Aggrekan und der Kollagen Typen I, II und X in Gelatinegelkryoschnitten wurden mittels immunhistochemischer Färbungen detektiert und dargestellt. MSCs wurden in den Gelen zuvor für neun Wochen mit Standarddifferenzierungsmedium, mit Differenzierungsmedium ohne Dexamethason oder mit Standardexpansionsmedium kultiviert.

Die Analyse des sGAG-Gehalts nach der Kultivierung von MSCs dreier Spender für neun Wochen ergab, dass in den Gelatinegelen kein sGAG abgelagert wurde, wenn diese mit MSC-Expansionsmedium kultiviert wurden (nicht dargestellt). Des Weiteren konnte, verglichen mit der Kultivierung mit Standarddifferenzierungsmedium, eine deutliche Erhöhung des sGAG-Gehaltes detektiert werden, wenn die Zellen ohne Dexamethason differenziert wurden. Der sGAG-Gehalt konnte so auf das 2,4-, 2,1- bzw. das 4,7-fache erhöht werden.

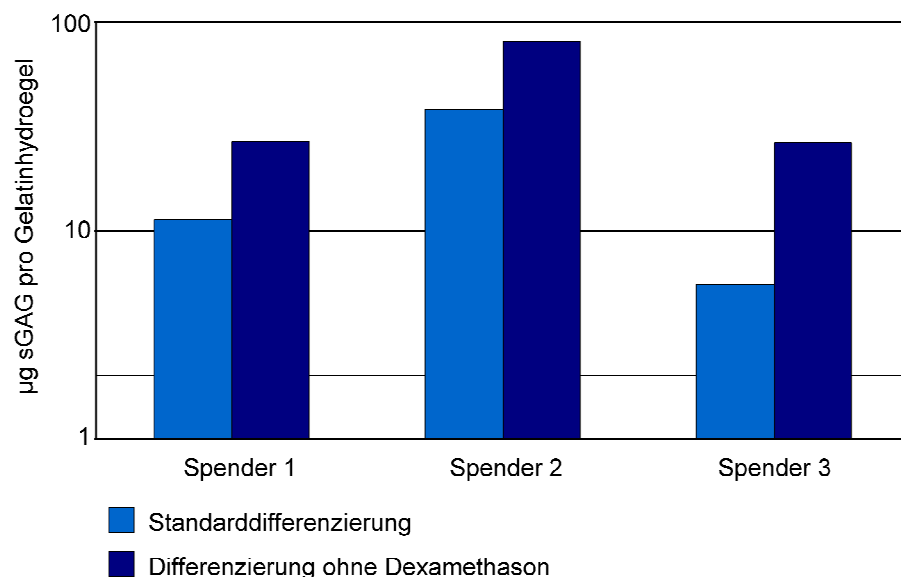


Abbildung 23: sGAG-Gehalt in Gelatinehydrogelen nach der Kultivierung von MSCs mit Standarddifferenzierungsmedium mit und ohne Dexamethason. MSCs wurden in Gelatinehydrogele eingebettet und für neun Wochen kultiviert. Der Gehalt an sGAG in den Gelen wurde mittels 1,9-Dimethylmethyleneblau bestimmt. Bei allen drei getesteten Spendern wurde mehr sGAG abgelagert, wenn die Differenzierung ohne Dexamethason durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch das Weglassen von Dexamethason bei der chondrogenen Differenzierung diese nicht negativ beeinflusst wurde. Extrazellulärmatrixmoleküle, wie z. B. Aggrecan und Kollagen Typ II, wurden auch ohne Dexamethasonzusatz synthetisiert. Die Analysen der Chondrozytenmarker-mRNA und von sGAG zeigten sogar eine erhöhte Matrixsynthese, wenn ohne Dexamethason chondrogen differenziert wurde.

4.5.2 Chondrogene Differenzierung ohne TGF- β 3

TGF-3 wird standardmäßig dem chondrogenen Differenzierungsmedium als Induktor zugesetzt. Für eine Untersuchung, ob es möglich ist, MSCs auch ohne TGF- β 3 chondrogen zu differenzieren, wurden die Zellen als Mikromassen und in Gelatine-HA-Gelen eingebettet für vier Wochen kultiviert. Den Zellen wurden dazu Standarddifferenzierungsmedium, Standarddifferenzierungsmedium ohne TGF- β 3 und MSC-Expansionsmedium zugesetzt. Morphologisch konnte zwischen den Mikromassen, welche mit Standarddifferenzierungsmedium und mit Medium ohne TGF- β 3 kultiviert wurden, kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 24A). MSCs, die mit MSC-Expansionsmedium kultiviert wurden, bildeten keine echten Mikromassen. Es entstand maximal ein Mikromasse-ähnlicher Multilayer, wie er in Abbildung 24A im rechten Bild dargestellt ist. Von diesen Multilayerkulturen wurde keine RT-qPCR-Analyse durchgeführt. Von allen anderen Kulturen wurden die relativen mRNA-Expressionen der Kollagen Typen I, II und X, von Aggrecan, MIA und Sox-9 bestimmt, um den Erfolg der chondrogenen Differenzierung zu überprüfen (Abbildung 24B). Nach der Kultivierung mit Standarddifferenzierungsmedium konnte eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung anhand der signifikanten Erhöhung der Genexpression aller untersuchten Gene bestätigt werden.

Signifikante Erhöhungen nach der Kultivierung mit Differenzierungsmedium ohne TGF- β 3 bzw. mit MSC-Expansionsmedium konnten für die Expression von Sox-9 detektiert werden (7- bis 10-fach im Median). Die Sox-9-Expression schien generell nicht von der Differenzierung, sondern von der dreidimensionalen Zellkultur abhängig zu sein. In allen dreidimensionalen Kulturen waren die Sox-9-Expressionen etwa gleich hoch, unabhängig vom verwendeten Medium. Signifikante Unterschiede in der Sox-9-Expression konnten lediglich in den Gelatine-HA-Gelen zwischen den standarddifferenzierten und den mit Expansionsmedium kultivierten MSCs detektiert werden (2,9-fach).

Bei der Untersuchung der Expression der anderen fünf getesteten Markergene konnten nach der Kultivierung mit Differenzierungsmedium ohne TGF- β 3 bzw. mit MSC-Expansionsmedium keine signifikanten Unterschiede zum undifferenzierten MSC-Monolayer detektiert werden. Lediglich die Kollagen Typ I-Expression erhöhte sich in Gelatine-HA-Gelkulturen signifikant auf das doppelte, nachdem die Zellen mit Differenzierungsmedium ohne TGF- β 3 kultiviert wurden.

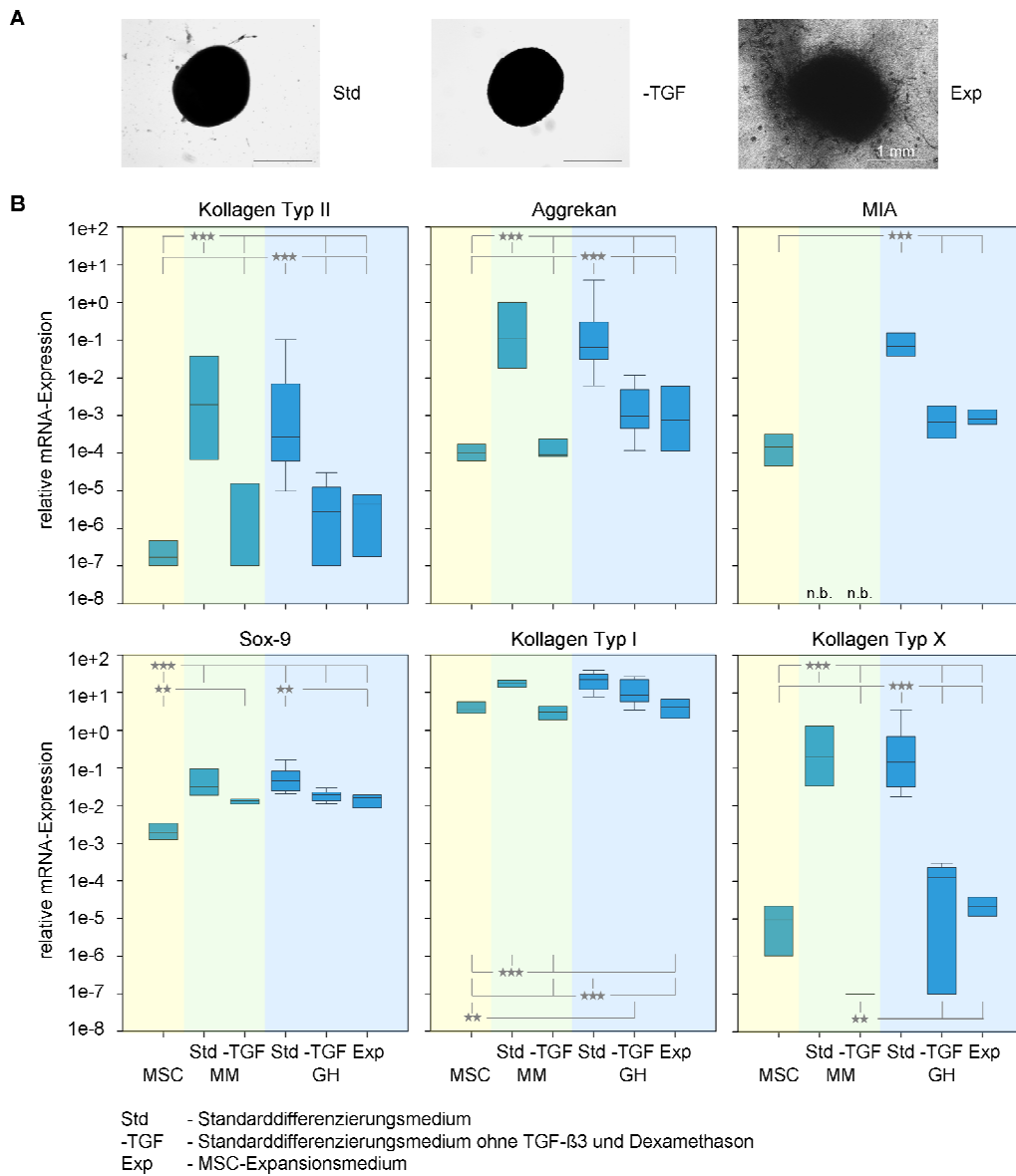


Abbildung 24: Effekt der Kultivierung ohne TGF-β3 auf die chondrogene Differenzierung von MSCs. Expandierte MSCs (MSC) wurden für vier Wochen mit Standarddifferenzierungsmedium (Std), mit Standarddifferenzierungsmedium ohne TGF-β3 (-TGF) und mit Standardexpansionsmedium (Exp) als Mikromassen (MM) und in Gelatine-HA-Gelen (GH) kultiviert. (A) Es wurden keine morphologischen Unterschiede zwischen den Mikromassen mit Standarddifferenzierung und denen mit Standarddifferenzierungsmedium ohne TGF-β3 detektiert. Wenn MSCs mit Expansionsmedium kultiviert wurden, konnten keine Mikromassen erhalten werden. (B) Die relative mRNA-Expression von Chondrozytenmarkern zeigte, dass die chondrogene Differenzierung nur dann erfolgreich war, wenn MSCs mit Standarddifferenzierungsmedium kultiviert wurden. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA-Bonferroni). (n.b. = nicht bestimmt)

Bei allen untersuchten Genen waren zwischen den mit Medium ohne TGF- β 3 kultivierten und den mit Standarddifferenzierungsmedium differenzierten MSCs signifikante Unterschiede festzustellen. Die standarddifferenzierten MSC-Kulturen exprimierten zwischen 61- und 1934412-fach mehr Kollagen Typ II, Aggrekan, MIA und Kollagen Typ X als mit Differenzierungsmedium ohne TGF- β 3 und mit MSC-Expansionsmedium kultivierte MSCs. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Kollagen Typ I-Expression festgestellt werden, wenn mit Standarddifferenzierungsmedium und mit Differenzierungsmedium ohne TGF- β 3 kultivierte in Gelatine-HA-Gele eingebettete MSCs analysiert wurden. In den Mikromassen konnten hingegen Expressionsunterschiede zum Standarddifferenzierungsmedium festgestellt werden (6-fach). Auch zwischen der Standarddifferenzierung und den mit MSC-Expansionsmedium kultivierten Hydrogelen waren signifikante mRNA-Expressionsunterschiede zu detektieren (5-fach). Generell war die Expression von Kollagen Typ I in allen MSC-Kulturen sehr hoch (im Median über 3, relativ zur Referenz-mRNA).

Da es nicht möglich war, ohne Zusatz von TGF- β 3 zum Differenzierungsmedium eine chondrogene Differenzierung zu erhalten, wurde untersucht, ob es eventuell ausreicht, die Differenzierung mit TGF- β 3 zu induzieren und dann im Verlauf der Kultivierung die Konzentration schrittweise zu verringern. MSCs von vier verschiedenen Spendern wurden hierfür für drei Wochen in Gelatine-HA-Gelen mit Standarddifferenzierungsmedium differenziert bzw. mit Differenzierungsmedium, bei dem TGF- β 3 zweimal wöchentlich um den Faktor 5 reduziert wurde, kultiviert. Somit wurden zu Beginn der Differenzierung 10 ng/ml TGF- β 3 zugesetzt und diese Menge so weit reduziert, so dass beim letzten Medienwechsel vor der Zellernte nur noch $3,2 \times 10^{-3}$ ng/ml TGF- β 3 dem Zellkulturmedium zugesetzt wurden. Die Analyse der mRNA-Expression von Kollagen Typ II, Aggrekan und Kollagen Typ X zeigte, dass trotz der drastischen Reduktion des Zytokins eine erhöhte Expression der Gene detektiert werden konnte, welche sich nicht signifikant von der der Standarddifferenzierung unterschied (Abbildung 25A). Die relative mRNA-Expression von Kollagen Typ II lag mit Standarddifferenzierungsmedium im Median bei $4,3 \times 10^{-4}$ und mit TGF- β 3-Reduzierung bei $1,3 \times 10^{-4}$, die Aggrekanexpression lag bei $1,7 \times 10^{-2}$ und $9,3 \times 10^{-3}$ und die Kollagen Typ X Expression bei $9,4 \times 10^{-2}$ und $5,6 \times 10^{-2}$.

Da die Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration von TGF- β 3 im Verlauf der Kultivierung sehr stark reduziert werden konnte, wurde weiterhin überprüft, ob es vielleicht ausreicht nur in den ersten Tagen der Differenzierung TGF- β 3 dem Medium zuzugeben. Die MSCs von zwei Spendern wurden hierfür in Gelatine-HA-Gele eingebettet und mit Differenzierungsmedium für insgesamt drei Wochen kultiviert. Nach 1, 3, 7 bzw. 14 Tagen wurde dieses durch Differenzierungsmedium ohne TGF- β 3 ersetzt und die Markergenexpressionen mit der der Standarddifferenzierung verglichen (Abbildung 25B). Es ist bei beiden Spendern zu erkennen, dass, wenn das Standardmedium nach 14 Tagen durch Medium ohne TGF- β 3 ersetzt wurde,

die Markergenexpression das gleiche Niveau erreichte wie bei der Standarddifferenzierung. Das frühere Weglassen des Zytokins führte hingegen zu verringerten Genexpressionen. So wurde bei Spender 1 nach 7 Tagen Kultivierung mit TGF- β 3 nur die Hälfte und bei Spender 2 nur 1/18 der Kollagen Typ II-mRNA-Menge detektiert, während nach 14 Tagen Kultivierung mit TGF- β 3 bei Spender 1 die gleiche Expression wie durch Standarddifferenzierung und bei Spender 2 die 19-fache Menge erhalten wurde. Die Aggrekanexpression erreichte nach 7 Tagen Zytokinexposition bei Spender 1 1/5 und bei Spender 2 1/22 der mRNA-Menge der Expression nach der Standarddifferenzierung, während nach 14 Tagen TGF- β 3-Zusatz bei Spender 1 die gleiche und bei Spender 2 die 8-fache Expression detektierbar war. Die Kollagen Typ X-Expression zeigte nach 7 Tagen Zytokingabe bei Spender 1 1/7 und bei Spender 2 1/27 der mRNA-Expression die nach der Standarddifferenzierung ermittelt wurde. Nach 14 Tagen Zytokingabe wurde die gleiche Expression wie bei der Standarddifferenzierung erhalten.

Die Ergebnisse zeigen, dass es nicht möglich war, MSCs erfolgreich chondrogen zu differenzieren, wenn dem Standarddifferenzierungsmedium von Beginn an TGF- β 3 entzogen wurde. Es war jedoch möglich, die Konzentration an TGF- β 3 im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich zu reduzieren, ohne die Differenzierung zu beeinträchtigen. Auch war es möglich nach zweiwöchiger Differenzierungsphase auf den Zusatz des Zytokins zum Medium zu verzichten, wobei auch hier keine Beeinträchtigung der Differenzierung erfolgte.

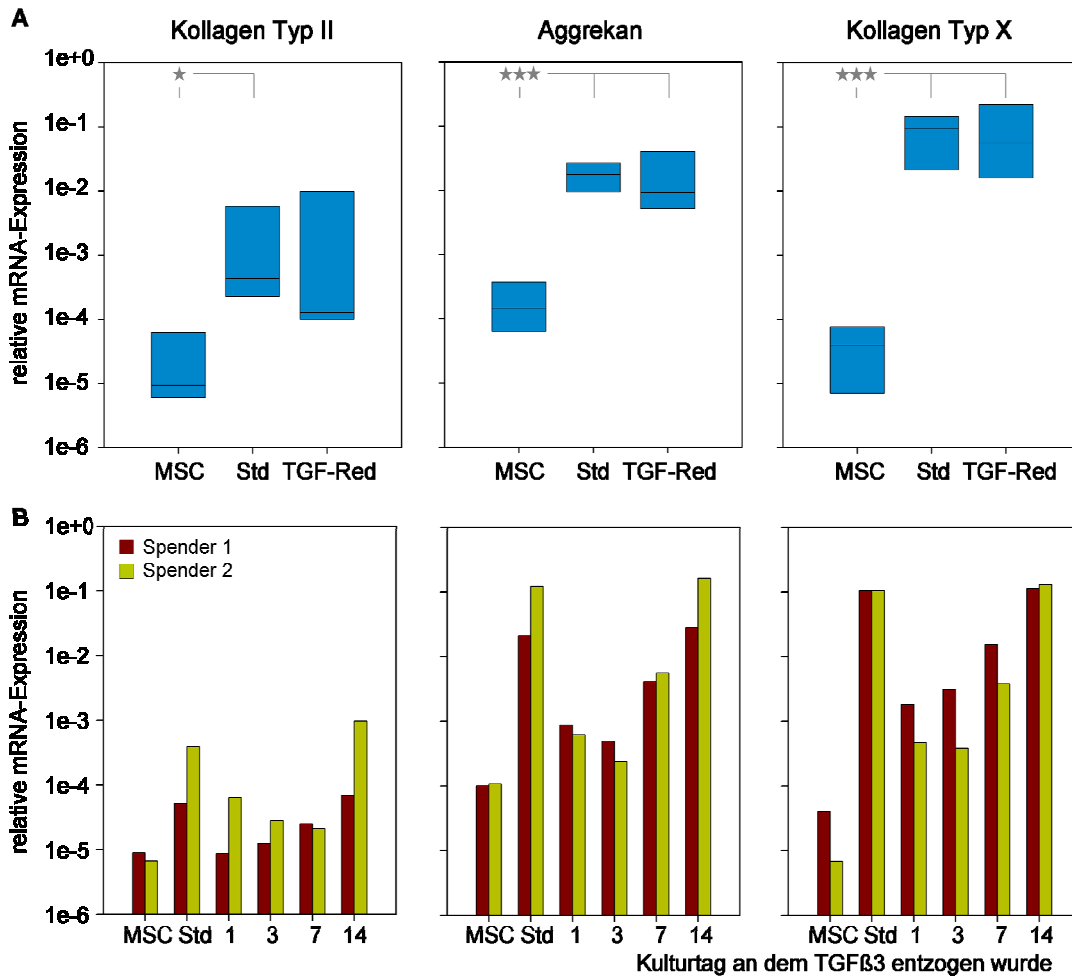


Abbildung 25: Effekt der Reduktion (A) und des Entfernens (B) von TGF-β3 nachdem die Differenzierung mit Standarddifferenzierungsmedium induziert wurde. MSCs wurden insgesamt für drei Wochen in Gelatine-HA-Gelen kultiviert. Hierbei wurde zweimal wöchentlich zu jedem Mediumwechsel die TGF-β3-Gabe um den Faktor 5 reduziert (A, TGF-Red; N = 4) bzw. nach 1, 3, 7 und 14 Kulturtagen auf Standarddifferenzierungsmedium ohne TGF-β3 gewechselt (B; N = 2). Dargestellt wurden die relativen mRNA-Expressionen von Kollagen Typ II, Aggrekan und Kollagen Typ X undifferenzierter MSCs (MSC), standarddifferenzierter MSCs (Std) und der auf eben beschriebene Weise behandelten Proben. Signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (*p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ANOVA-Bonferroni).

5 DISKUSSION

Eine deutsche Krankenkasse veröffentlichte 2009 einen Bericht der zeigte, dass jeder 20. Versicherte mindestens einmal pro Jahr mit der Diagnose "Bandscheibenerkrankung" konfrontiert wurde, wobei jeder 60. Versicherungsnehmer mindestens einmal im Jahr aufgrund solch einer Diagnose arbeitsunfähig wurde [134]. Die hohe Zahl der Erkrankten zeigt die Wichtigkeit und Notwendigkeit der Entwicklung einer nachhaltigen Therapie von Bandscheibenerkrankungen. Bei Degenerationserkrankungen der Bandscheibe ist bis zum heutigen Zeitpunkt keine regenerative Heilmethode vorhanden. Eine Möglichkeit zur Therapie könnte die Implantation mesenchymaler stromaler Vorläuferzellen (MSCs) aus dem Knochenmark sein. Diese besitzen nach der Differenzierung zu einem chondrozytären Phänotyp die Fähigkeit, Extrazellulärmatrix neu zu bilden und haben somit das Potential die Bandscheibenfunktion nachhaltig zu regenerieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, welchen Einfluss unterschiedliche MSC-Isolierungs- und Expansionsprotokolle auf die chondrogene Differenzierung haben, dass sich Gelatine-basierte Hydrogele für eine Differenzierung von Zellen eignen, dass die Differenzierung der Zellen durch Hypoxie gefördert wird und dass die *in vitro* Differenzierungsprotokolle für klinische Anwendungen angepasst werden können.

5.1 Die Qualität der Chondrogenese wird bereits durch die MSC-Isolierung und -Expansion beeinflusst

In der experimentellen Forschung wird auf verschiedenste Quellen adulter Vorläuferzellen für eine chondrogene Differenzierung zurückgegriffen. So werden Vorläuferzellen unter anderem aus Fettgewebe [135, 136], Nabelschnurgewebe [106, 137, 138], dem Synovium [139-141] oder aus Knochenmark [142-144] gewonnen. In dieser Arbeit wurden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark verwendet. Dieses hat den Vorteil, dass es, wenn es später in der regenerativen Medizin verwendet werden würde, dem Patienten ohne großen Aufwand entnehmbar ist [104, 145, 146]. Es wird keine zusätzliche Operation benötigt und die daraus isolierten Vorläuferzellen besitzen, auch wenn es sich um ältere Patienten handelt, ein hohes chondrogenes Potential [122, 147-149]. Für die Isolierung der MSCs aus dem Knochenmark liegen keine einheitlichen Protokolle vor. In den meisten Protokollen wird nach dem Waschen der Knochenmarkszellen eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt und die Zellen der Interphaseschicht werden auf Zellkulturplastik kultiviert [65, 150-160]. In einigen Protokollen wird aber auf die Dichtegradientenzentrifugation verzichtet [143, 148, 161], so auch im Labor Tuan [162, 163]. Die gewaschenen Knochenmarkszellen werden hier direkt auf Zellkulturplastik gegeben und kultiviert. Die unter beiden Protokollbedingungen gewonnenen, adhären Zellen werden als MSCs definiert. In der vorliegenden Arbeit wurden

Vorläuferzellen verwendet, welche sowohl mit (Standardprotokoll am NMI) als auch ohne (Protokoll vom Labor Tuan) Dichtegradientenzentrifugation isoliert wurden.

Da Knochenmark nur sehr wenige MSCs enthält (eine Zelle unter 1×10^4 bis 2×10^6 Knochenmarkszellen, je nach Alter [164]), müssen die Zellen für Therapieanwendungen *in vitro* expandiert werden. Allerdings sind nicht nur die Protokolle für die MSC-Isolierung uneinheitlich in der Literatur, sondern auch die Zusammensetzung der Kulturmedien für die darauf folgende Expansion der Zellen. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Medien miteinander verglichen. Zum einen Standardexpansionsmedium des NMI, welches D-MEM, MCDB 201 Medium, ITS+1, Ascorbinsäurephosphat, Dexamethason, FBS und die Zytokine PDGF-BB und EGF enthielt, und zum anderen Medium, welches im Labor Tuan verwendet wird. Dieses enthielt α -MEM, FBS und das Zytokin FGF-2. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Verwendung unterschiedlicher Isolierungs- und Expansionsprotokolle MSCs mit unterschiedlichem Phänotyp erhalten wurden. Auch die Expression chondrozytenspezifischer Markergene zeigte signifikante Unterschiede in den undifferenzierten Zellen. Es konnte auch von anderen Wissenschaftlern gezeigt werden, dass die Wahl des Expansionsmediums Einfluss auf den MSC-Phänotyp nimmt. So konnten Bieback und auch Battula und Kollegen ein verändertes Oberflächenmarkerexpressionsprofil zeigen, je nachdem ob MSCs mit oder ohne Serum kultiviert wurden [159, 160]. Chase und Kollegen zeigten, dass MSCs, die serumfrei kultiviert wurden, eine spindelförmige Morphologie besaßen und sich in Bündeln anordneten, während mit Serum kultivierte MSCs eine eher fibroblastenartige, flächige Morphologie besaßen und einen einheitlichen Monolayer bildeten [165].

Von großer Bedeutung ist, ob der unterschiedliche Zell-Phänotyp zu unterschiedlichen Qualitäten bei der chondrogenen Differenzierung führt. Die MSC-Expansionskulturen wurden zur Überprüfung der Differenzierbarkeit als Mikromassen chondrogen differenziert. Die Analyse der Markergene ergab, dass, mit Ausnahme von Kollagen Typ II, keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression nach zweiwöchiger Differenzierung detektiert werden konnten. Die Expressionsanalysen wurden in zwei verschiedenen Laboren (in Deutschland und in den USA) mit unterschiedlichen Materialien, Chemikalien und Geräten durchgeführt. Trotzdem wurde ein einheitliches Expressionsmuster erhalten. Dies bestätigt auch die Konsistenz der RT-qPCR als Analyseverfahren.

Beim direkten Vergleich zweier Spender wurden allerdings Unterschiede in der Größe der Mikromassen festgestellt (bei ähnlichem DNA-Gehalt [Daten nicht gezeigt]), wenn die MSCs auf unterschiedliche Weise isoliert und kultiviert wurden. Auch die Menge an sezerniertem sGAG schien vom vorher verwendeten Isolierungs- und Expansionsprotokoll abhängig zu sein. Mikromassekulturen mit MSCs, welche nach Protokoll des Labors Tuan isoliert und expandiert wurden, sezernierten mehr sGAG als die Mikromassen des Standardprotokolls. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die MSCs, welche nach dem Protokoll des Labors Tuan erhalten wurden, bereits vor der Induktion der Differenzierung eine erhöhte Extrazellulärmatrixgenexpression zeigten und somit die Synthese der Extrazellulärmatrix

vermutlich schneller erfolgen konnte, während die Synthese in den nach NMI-Protokoll erhaltenen Mikromassen erst später im Kulturverlauf einsetzte. Die Ergebnisse zeigen, dass die Qualität der chondrogenen Differenzierung bereits von der MSC-Isolierung und Expansion abhängig ist. In vielen wissenschaftlichen Publikationen wird gezeigt, dass MSCs, welche mit unterschiedlichen Medien expandiert worden sind, ihr chondrogenes Potential beibehalten [158, 165]. Einige berichten ebenfalls von Unterschieden im Differenzierungsverhalten der MSCs. So berichteten Ng und Kollegen ebenso von unterschiedlich großen Pelletkulturen, je nachdem, ob dem Expansionsmedium zuvor FGF zugegeben wurde oder nicht [166]. Shahdadfar und Kollegen beobachteten eine verzögerte Differenzierung von MSCs, wenn diese in Humanserum anstelle von FBS expandiert wurden [167]. Die Autoren vermuten, dass die Zellen durch Kultivierung mit FBS bereits Schritte des Differenzierungsprozesses durchlaufen haben, welche die MSCs nach Humanserumgabe erst noch zu durchlaufen haben. Ob hierbei alle MSC-Subpopulationen bereits eine Prägung durchlaufen, oder ob einzelne Subpopulationen unterschiedlich auf die äußeren Bedingungen reagieren, indem sie z. B. unterdrückt oder gefördert werden, ist hierbei noch unklar.

Für Anwendungen im Patienten ist es unumgänglich Protokolle zu verwenden, die eine spätere Zulassung in der Klinik erlauben. Ein besonders kritischer Faktor hierbei ist der Einsatz von FBS im Expansionsmedium, da dieses tierischen Ursprungs ist [168]. Es können verstärkt Bemühungen von Wissenschaftlern festgestellt werden dieses Problem zu lösen, indem Alternativen für Seren tierischen Ursprungs zur Expansion von MSCs verwendet werden. Alternativen sind unter anderen humanes Thrombozytenlysat und Humanserum [158, 160, 169, 170]. So haben Schallmoser und Kollegen z. B. ein Protokoll entwickelt um eine für die Zelltransplantation geeignete MSC-Menge in möglichst geringer Zeit zu erhalten, wobei FBS im Medium durch humanes Thrombozytenlysat ersetzt wurde [171, 172]. Auch dieses Protokoll sieht die Verwendung von Knochenmarkszellen vor, welche nicht zuvor im Dichtegradienten aufgetrennt wurden.

In dieser Arbeit wurde auf die Testung klinisch applikabler MSC-Expansionsprotokolle verzichtet, da hauptsächlich auf einen Stock MSCs zurückgegriffen wurde, der bereits nach Protokoll des NMIs isoliert, kultiviert und anschließend kryokonserviert wurde.

5.2 Gelatine-basierte Hydrogele sind für eine chondrogene Differenzierung von MSCs geeignet

Derzeit ist noch unklar, in welchem Differenzierungsstadium MSCs später für eine Bandscheibenregeneration verwendet werden können. Es gibt zwei hypothetische Ansätze, zum einen die Verwendung undifferenzierter MSCs, welche *in situ* nach der Transplantation in der Bandscheibe differenzieren, und zum anderen die Injektion bereits vordifferenzierter Zellen.

Für die Transplantation undifferenzierter als auch differenzierter MSCs ist ein Zellträger von Vorteil, welcher injizierbar ist, die Zellen in der Bandscheibe verankert und eine kontrollierte Zelldichte implantieren kann. Gelatine ist ein Material, welches nach einer Erwärmung auf 37 °C in flüssiger Form vorliegt und erst nach Zusatz von Transglutaminase ein Hydrogel formt [173]. Diese Eigenschaft ermöglicht eine Injizierbarkeit des Hydrogels, wobei eine Applikation mittels Doppelkammerspritze möglich ist. Eine der Kammern der Spritze kann das Enzym und die andere Kammer die Zellen und die Gelatine enthalten. Erst nach der Injektion kommt es zur Reaktion und das Hydrogel bildet sich *in situ*.

Die Bandscheibe ist ein zellarmes Gewebe, welches einen niedrigen pH-Wert und eine reduzierte Nährstoffversorgung aufweist [99, 174, 175]. Aus diesem Grund sollte die Zelldichte des implantierten Hydrogels etwa so groß sein wie die des nativen Gewebes. Es sind nur sehr wenige Informationen in der Literatur über die Zelldichte in der nativen Bandscheibe aufzufinden. Diese liegt im Nucleus pulposus etwa zwischen zwei und fünf Millionen Zellen pro cm³, wobei sie aufgrund von Alterung und Degeneration stark abnimmt [97, 99, 174, 176, 177]. Mehr als 50% aller Zellen der Bandscheiben eines Erwachsenen sind nekrotisch [178]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine niedrige Zellkonzentration für die Einbettung der MSCs in die Hydrogele gewählt, um dem begrenzten Nährstoffangebot im Bandscheibengewebe gerecht werden zu können. Die Überlebenschance von vitalen und metabolisch aktiven Zellen nach der Implantation in die Bandscheibe wird so voraussichtlich viel höher sein. Basierend auf der Grundlage experimenteller Daten der Arbeitsgruppe über die Isolierung von Zellen aus alterndem Bandscheibengewebe nach enzymatischem Verdau, wurde in dieser Arbeit eine Zellkonzentration genutzt, welche vergleichbar mit der im nativen Gewebe ist.

Für spätere Anwendungen in der Zelltherapie muss die Hydrogelmatrix ein Überleben der Zellen über einen längeren Zeitraum gewährleisten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zellen *in vitro* über mindestens neun Wochen hinweg am Leben blieben. Auch ist es für eine erfolgreiche Geweberegeneration wichtig, dass eine Interaktion zwischen dem Implantat und dem Zielgewebe existiert [179, 180]. Nöth und Kollegen beschreiben, dass bei der Verwendung von Kollagen Typ I-Hydrogelen eine Gelkontraktion von bis zu 75% auftritt [181]. Gelkontraktionen beobachteten unter anderem auch Zheng und Kollegen mit MSCs des Kaninchens in Kollagen Typ I-Gelen [182], und Dickhut und Kollegen für MSCs aus humanem Fettgewebe in Kollagen Typ I- und Fibringelen, in Matrigel und PuraMatrix [183]. Eine Kontraktion könnte zu einer reduzierten Implantat-Gewebe-Interaktion führen und somit für Implantationszwecke nachteilig sein. Während der Kultivierung der Gelatine-basierten Hydrogele konnten im Verlauf der Untersuchungen dieser Arbeit keine Anzeichen für eine Gelkontraktion beobachtet werden. Zusätzlich zeigten Kuwahara und Kollegen, dass Transglutaminase-vernetzte Gelatinegele nach der Injektion *in situ* lokal verankert werden, indem endogene Kollagene der Extrazellulärmatrix des Gewebes mit den Gelatineketten quervernetzen [184]. Damit wird gewährleistet, dass die eingebetteten Zellen in der Defektstelle verbleiben, was den Erfolg einer Zelltransplantation erhöhen dürfte.

Für die Verwendung vordifferenzierter MSCs für eine Bandscheibenregeneration, müssen diese in einer Form vorliegen, welche eine Transplantation erlaubt. Mikromassekulturen sind für Anwendungen in der Klinik weniger geeignet, da die differenzierten Zellen praktisch nicht wieder aus dem Zellverband herauslösbar sind und die Zelldichte für eine Implantation aufgrund der Nährstofflimitation zu groß ist, um ein Überleben in der Bandscheibe gewährleisten zu können. Hydrogele, wie das hier verwendete Gelatinegel, sind deshalb geeignete Alternativen für Mikromassen. Die Zellen können durch enzymatischen Verdau der denaturierten Kollagenketten der Gelatine einfach wieder aus dem Hydrogel herausgelöst werden [79].

Eine Grundvoraussetzung der Verwendung von Trägermaterialien zur Vordifferenzierung von MSCs ist, dass sich die Zellen in diesen überhaupt chondrogen differenzieren lassen. Auch sollte das Material die Chondrogenese nicht unterbinden, wenn das Ziel verfolgt wird, später undifferenzierte MSCs in die Bandscheibe zu injizieren. Egal welcher Therapieansatz verfolgt wird, es ist zwingend erforderlich nachzuweisen, dass in das Gelatinegel eingebettete MSCs das Potential beibehalten, chondrogen zu differenzieren. Hierfür wurden in dieser Arbeit MSCs *in vitro* differenziert und die Synthese von Extrazellulärmatrix und die Markergenexpression analysiert. Die Expression von Chondrozytenmarkern undifferenzierter MSCs, als Mikromassen und in Hydrogelen differenzierter MSCs und auch kultivierter Chondrozyten hyalinen Knorpels und kultivierter Bandscheibenzellen wurde mit der RT-qPCR analysiert und die Expressionsniveaus miteinander verglichen. Da hier verschiedene Zelltypen, Kultivierungsformen und im Verlauf der Arbeit zusätzlich auch unterschiedliche Kulturbedingungen verwendet wurden, wurde vorab ein geeignetes Referenzgen etabliert. YWHAZ-mRNA wurde dabei als geeignete Referenz unter den getesteten Bedingungen identifiziert und für sämtliche Expressionsanalysen zur Normierung verwendet. YWHAZ wurde ebenso als geeignete Referenz im Zusammenhang mit der chondrogenen Differenzierung von Vorläuferzellen aus dem Fettgewebe von Fink und Kollegen [185] und bei der Verwendung von Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurgewebe von Wang und Kollegen identifiziert [186]. Auch Curtis und Kollegen identifizierten YWHAZ als eines der am stabilsten exprimierten Gene bei der Expansion einer Subpopulation von MSCs aus dem Knochenmark [187].

Die Analysen der Kollagen Typ II-, Aggrekan-, MIA- und Sox-9-mRNA zeigten in den chondrogen differenzierten MSCs als auch in den Chondrozyten- und Bandscheibenzellkulturen eine erhöhte Expression. Es konnten bei allen getesteten Genen keine Unterschiede in den Expressionsniveaus zwischen den differenzierten MSC-Kulturen detektiert werden, unabhängig davon ob die Zellen hochdicht als Mikromassen oder in den Gelatinegelen überwiegend ohne Zell-Zell-Kontakt differenziert wurden. Die metabolische Aktivität der Zellen wird demnach nicht durch die Gelatine-basierten Hydrogele vermindert. Dass in den Hydrogelen Matrixmoleküle synthetisiert werden, zeigen auch die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen und der sGAG-Mengenbestimmungen. Zell-Zell-Kontakte scheinen für eine chondrogene Differenzierung offensichtlich nicht obligatorisch zu sein, da in

den Gelatinehydrogelen die Zellen bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelldichte sporadisch verteilt waren. Die Bildung einer kondensierten Struktur, wie man sie bei der Mikromasse vorfindet, ist für die Induktion der Chondrogenese demnach nicht notwendig. Ursprünglich wurde die Notwendigkeit der Kondensation für das Gelingen der chondrogenen Differenzierung von Johnstone und Kollegen angenommen [74]. In den letzten Jahren zeigten die Arbeiten verschiedener Wissenschaftler jedoch, dass diese auch bei geringer Zelldichte möglich ist, und somit, dass diese Hypothese widerlegt werden kann [46, 181, 188-191].

Neben der Expression der oben genannten Markergene wurde auch Kollagen Typ I, ein Marker für Bindegewebszellen, in allen getesteten Zellkulturen stark exprimiert, wobei in differenzierten MSCs die stärksten Expressionen detektiert wurden. Auch konnten in differenzierten MSCs starke Expressionen von Kollagen Typ X und Alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden. Beide Gene werden als Marker für hypertrophe Chondrozyten gesehen [192-195]. Im Verlauf dieser Arbeit konnte die Rolle der Moleküle während der MSC-Differenzierung nicht geklärt werden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass Kollagen Typ X eventuell eine Funktion beim korrekten Aufbau der Extrazellulärmatrix übernimmt, da die Zugabe von Kollagen Typ X-Antikörpern zu dem Standarddifferenzierungsmedium auf die Mikromasseentstehung einwirkte (Daten nicht gezeigt). So konnten in Anwesenheit der Antikörper teilweise keine Mikromassen bzw. nur weniger kompakte Strukturen erhalten werden. Ein weiterer Hinweis der Funktion von Kollagen Typ X als Gerüstsubstanz für eine Chondrozytenmatrix ist die Tatsache, dass das Gen auch dann sehr stark exprimiert wurde, wenn andere Extrazellulärmatrixgene bei der Differenzierung nur gering exprimiert wurden, wenn demnach nur eine ungenügende Differenzierung erfolgte (Daten nicht gezeigt). Eine frühe starke Kollagen Typ X-Expression, teilweise noch vor der Expression von Kollagen Typ II, haben auch Mwale und Kollegen in ihrer Veröffentlichung beschrieben [196]. Die Rolle für Kollagen Typ X muss in weiteren Studien noch geklärt werden, einschließlich der Möglichkeit, dass dessen Vorkommen nur ein *in vitro*-Artefakt ist [197]. Die Co-Expression der Kollagen Typen I und X sowie anderer Chondrozytenmarker wurde in der Literatur zuvor gezeigt [198-200].

Der Zusatz von Hyaluronan (HA) zu den Gelatinegelen beeinflusste den Differenzierungsprozess nicht. Die HA-Konzentration, welche hier verwendet wurde, war äquivalent zu der Konzentration, wie sie in der gesunden Bandscheibe vorkommt (etwa 0,3 % bis 0,4 %) [201]. HA wird bereits bei der Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen eingesetzt und besitzt sowohl entzündungshemmende als auch zellschützende Eigenschaften [202]. Durch eine hohe Wasserbindekapazität sorgt das Glykosaminoglykan zudem für einen ausgeglichenen Wasserhaushalt. Somit könnte der Zusatz zu einem Hydrogel einen positiven Einfluss auf den Erfolg der Zelltherapie haben.

In der Literatur werden viele verschiedene Hydrogele genannt, welche sich für eine chondrogene Differenzierung eignen [203-207]. So wurde am NMI z. B. ein Hydrogel auf der Basis von humanem Serumalbumin entwickelt, welches für eine Bandscheibenregeneration

optimiert wurde. Die TETEC AG erhielt bereits Ende des Jahres 2008 eine Herstellungserlaubnis für das Gel, so dass dieses für Injektionen autologer Bandscheibenzellen bei der Behandlung von Bandscheibenvorfällen verwendet werden darf. Im Gegensatz zum Gelatinehydrogel muss das Humanserumalbumingel vor der Verwendung nicht auf 37 °C erwärmt werden, was eine vereinfachte Handhabung für den operierenden Chirurgen bedeutet. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die chondrogene Differenzierung von MSCs auch in diesem Hydrogel getestet [208], wobei keine Unterschiede zur Differenzierbarkeit in den Gelatinegelen detektiert werden konnten. Auf eine Darstellung der Daten wurde aus diesem Grund verzichtet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass man bei der Verwendung von Hydrogelen für die MSC-Differenzierung nicht auf ein bestimmtes Material festgelegt ist, sondern dass sich die Zellen scheinbar recht unabhängig vom gewählten Material differenzieren lassen. In der Literatur wird beschrieben, dass die Steifheit eines Materials auf den Differenzierungsprozess von MSCs Auswirkungen hat [209-211]. Die in dieser Arbeit verwendeten Hydrogele waren von ähnlicher Festigkeit, unterschiedliche Steifigkeiten wurden nicht getestet.

5.3 Hypoxie bereits während der MSC-Expansion verbessert die Chondrogenese

Dass sich Hydrogele für eine Differenzierung von MSCs prinzipiell eignen, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Standardkulturbedingungen *in vitro* sind implantierte Zellen jedoch *in situ* in einer Umgebung, welche aufgrund der Avaskularität der Bandscheibe nur einen sehr geringen Sauerstoffgehalt hat [99, 212, 213]. Wie also reagieren die Zellen auf eine Umgebung, in welcher hypoxische Bedingungen vorherrschen? Sind MSCs unter diesen Bedingungen überhaupt in der Lage chondrogen zu differenzieren bzw. den chondrozytären Phänotyp aufrechtzuerhalten? Um diese Fragen zu beantworten, wurden MSCs während der Differenzierung unter hypoxischen Bedingungen gehalten und die Expression von Chondrozytenmarkern und die Synthese von Extrazellulärmatrix analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass sich durch die Reduktion des Sauerstoffs auf 4 % die Differenzierbarkeit der Zellen nicht verschlechterte. Sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Kulturbedingungen wurde Extrazellulärmatrix abgelagert, egal ob die MSCs als Mikromassen oder in Hydrogelen kultiviert wurden. Die Expressionsanalysen ergaben sogar signifikante Erhöhungen des mRNA-Gehaltes von Chondrozytenmarkern nach hypoxischer Differenzierung.

Da sich eine Sauerstoffreduktion während der Differenzierung positiv auf die Differenzierbarkeit von MSCs zum chondrozytären Phänotyp auswirkte, wurde weiterhin getestet, ob man auch durch die Kultivierung undifferenzierter MSCs unter Hypoxie bereits eine Verbesserung der anschließenden chondrogenen Differenzierung erhält. Aufgrund der Reduktion des Sauerstoffs auf 4 % während der MSC-Expansion konnte bei kultivierten

Mikromassen Vergrößerungen der Durchmesser detektiert werden. Ebenso resultierten daraus erhöhte Expressionen von Kollagen Typ II-, Aggrecan-, MIA-, Sox-9- und Kollagen Typ X-mRNA und auch die sGAG-Synthese stieg an. Die Differenzierung fördernde Effekte konnten ebenso in Hydrogelen detektiert werden, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Hyaluronan. Einen für die chondrogene Differenzierung förderlichen Effekt der Hypoxie während der MSC-Expansion wurde auch von Xu und Kollegen für murine Vorläuferzellen des Fettgewebes [214] und von Zscharnack und Kollegen für MSCs des Schafs beschrieben [46]. Die Sox-9-Genexpression wurde in den Hydrogelen nicht von der Sauerstoffkonzentration beeinflusst, ähnlich wurde dies auch bereits von Hardingham und Kollegen beschrieben [215]. Da Sox-9 als der wichtigste Transkriptionsfaktor für die Synthese von Kollagen Typ II, MIA und Aggrecan beschrieben ist, scheint dies im Widerspruch zum starken Anstieg der Genexpressionen der genannten Gene zu stehen. Die Sox-9-Expression korreliert jedoch nicht direkt mit der Expression funktioneller Knorpelgene. Sobald Sox-9 das Maximum erreicht, werden Matrixgene offensichtlich auch durch andere Mechanismen reguliert. Chondrozyten des artikulären Knorpels z. B. haben auch dann einen hohen Sox-9-Spiegel, wenn Matrixgene herunter reguliert wurden, wie es bei der Gewebemöostase oder bei der Zellteilung *in vitro* vorzufinden ist [216]. Ähnlich wie bei Sox-9, wird auch die Kollagen Typ I-Expression nicht von der Sauerstoffkonzentration der Umgebung beeinflusst. Kollagen Typ I ist unter allen getesteten Genen das am stärksten exprimierte, so dass hier die Vermutung nahe liegt, dass die maximale Expressionsrate bereits erreicht ist und somit Faktoren von außen sich nicht mehr steigend auf die Expression auswirken können.

Sowohl die Ergebnisse der Expressionsanalysen als auch die sGAG-Mengenbestimmungen zeigten, dass die qualitativ besten Differenzierungsergebnisse erhalten werden, wenn die komplette Zellkultivierung unter hypoxischen Bedingungen stattfindet. Die vorliegenden Daten legen nahe, dass eine hypoxische Vorkonditionierung von MSCs vor der Implantation in die Bandscheibe von Vorteil für das spätere zelluläre Verhalten sein könnte. Durch die Verwendung eines festen Gasgemisches, welches das Einstellen hypoxischer Bedingungen erlaubt, kann so auf einfache Weise die Qualität der chondrogenen Differenzierung verbessert werden. Anders als bei der Zugabe biologisch aktiver Substanzen, wird durch die Sauerstoffreduktion während der Zellkultivierung die Zulassung eines klinischen Produkts nicht erschwert, womit hypoxische Zellkultivierungen für Anwendungen in der Klinik geeignet sind. Bei der Verwendung vordifferenzierter MSCs für die Bandscheibenregeneration würde es sich anbieten, die komplette *in vitro*-Kultivierung unter Hypoxie durchzuführen, um das bestmögliche Differenzierungsergebnis zu erhalten. Der Mechanismus, welcher eine Verbesserung der Chondrogenese bewirkt, wurde in dieser Arbeit nicht aufgeklärt. Womöglich ist dies aber eine Anpassung der Zellen an die physiologischen Sauerstoffbedingungen des Zielgewebes. So haben Chondrozyten z. B. in avaskulärem Knorpel niedrige Sauerstoffansprüche, während Osteoblasten im vaskulären Knochen erhöhte Sauerstoffkonzentrationen benötigen. Diese Hypothese wird durch Studien gestärkt, die

zeigen, dass die osteogene Differenzierung durch einen niedrigen Sauerstoffgehalt vermindert und bei 20 % Sauerstoff gefördert wird [217, 218]. So könnte die Vorkonditionierung von MSCs an hypoxische Gewebebedingungen unterstützend auf den chondrogenen Prozess wirken und gleichzeitig eine ungewollte Differenzierung in die osteogene Linie unterdrücken. Welche Rolle dabei einzelne MSC-Subpopulationen spielen, bleibt dabei ungeklärt.

Die Ergebnisse der Gelatinehydrogele und Mikromassen vervollständigen andere wissenschaftliche Veröffentlichungen, welche zeigen, dass Hypoxie die chondrogene Differenzierung von MSCs während der Differenzierungsphase fördert [200, 219-223]. Obwohl die Untersuchungen mit verschiedenen Zellisolierungsmethoden, Versuchsaufbaus, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen usw. durchgeführt wurden, kamen alle Autoren zu dem Schluss, dass die Hypoxie die Chondrogenese fördert. Allein die Arbeit von Karlsen und Kollegen zeigte keinen Einfluss einer Sauerstoffreduktion auf 6 % auf die chondrogene Differenzierung humaner MSCs [142].

Insgesamt bietet eine Kombination aus Hydrogelen und hypoxischen Bedingungen ein sehr günstiges Umfeld für die chondrogene Differenzierung humaner MSCs bei Anwendungen in der Regenerationsmedizin. Dies ist unabhängig davon, ob bei einer Bandscheibenregeneration später hypoxisch expandierte, oder ob hypoxisch expandierte und vordifferenzierte MSCs injiziert werden sollen.

5.4 Die Differenzierungsprotokolle konnten für die klinische Anwendung optimiert werden

Sämtliche Medien und Reagenzien, welche bei der chondrogenen Differenzierung von MSCs benutzt werden, müssen nach *good manufacturing practices* (GMP)-Standards hergestellt werden, wenn die Zell-Gelkonstrukte in Europa für klinische Anwendungen zugelassen werden sollen. Zusätzlich erhöht jede zugesetzte biologisch aktive Substanz die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen bei Anwendung im Patienten. Aus diesen Gründen sollten möglichst wenige Substanzen verwendet werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde deshalb geprüft, ob auf den Zusatz von Dexamethason und TGF- β 3 zum Standarddifferenzierungsmedium verzichtet werden kann, ohne die chondrogene Differenzierbarkeit zu beeinträchtigen.

Dexamethason ist ein Glukokortikoid, welches bereits von Johnstone und Kollegen bei der chondrogenen Differenzierung von MSCs eingesetzt wurde [74]. Die Autoren beschreiben einen teilweise die Chondrogenese fördernden Effekt der Substanz bei der Kultivierung von MSCs der Ratte in Pelletform. Aufbauend auf die Resultate dieser Publikation wurde dem Differenzierungsmedium seither Dexamethason zugesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei chondrogenen Differenzierungen humaner Zellen auf den Zusatz des Glukokortikoids verzichtet werden kann. Auch ohne Dexamethason konnten MSCs in den Hydrogelen chondrogen differenziert werden, wobei dadurch sogar eine erhöhte Extrazellulärmatrixsynthese detektiert werden konnte. Kurth und Kollegen beschrieben in ihrer

Publikation bei der Verwendung von humanen Vorläuferzellen aus dem Synovium einen die Chondrogenese inhibierenden Effekt durch Dexamethason, wenn BMP2 zur Differenzierung verwendet wurde, während keine Beeinflussung bei der Verwendung von TGF- β 1 auftrat [224]. Eine frühzeitige Suppression der Proteoglykansynthese durch Dexamethason konnte auch von Awad und Kollegen bei der Differenzierung humaner Vorläuferzellen des Fettgewebes mit TGF- β 1 festgestellt werden [225]. Gegenteilige Effekte beobachteten Diekman und Kollegen bei der Differenzierung humaner Vorläuferzellen des Fettgewebes mit BMP6 [209]. Da in beiden Studien sowohl gleiche Dexamethasonkonzentrationen als auch Alginatgele als Zellträger verwendet wurden, scheint die Wirkung des Dexamethasons demnach vom für die Differenzierung verwendeten Zytokin abhängig zu sein.

Johnstone und Kollegen konnten in einigen Pellets auch ohne den Zusatz von TGF- β eine Synthese von Kollagen Typ II nachweisen [74]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden und auch anderer Arbeiten zeigen jedoch, dass, anders als bei MSCs der Ratte und des Kaninchens [226], bei humanen MSCs auf TGF- β 3 als Induktor der Chondrogenese nicht komplett verzichtet werden kann, da die Differenzierung sonst nicht statt findet [227, 228]. Es ist möglich, dass diese widersprüchlichen Befunde darauf zurückzuführen sind, dass induzierende Zytokine von den Autoren zwar nicht extra dem Medium zugefügt wurden, aufgrund der Kultivierung mit Serum jedoch eine unbestimmte Konzentration an Differenzierungsinduktoren wie TGF- β vorhanden ist, wodurch der Anschein entsteht, dass auf externe Zytokingabe verzichtet werden kann. Die Existenz von unter anderem TGF- β 1 und TGF- β 2 in Serumproben konnte in Untersuchungen der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF- β 3 im Verlauf der Kultivierung stark reduziert, bzw. nach zweiwöchiger Differenzierungsphase komplett aus dem Medium weggelassen werden kann, ohne den chondrozytären Phänotyp zu verlieren. Dies steht im Einklang mit Angaben von Publikationen, in denen ebenfalls gezeigt wurde, dass nach einer bestimmten Kultivierungszeit auf das Zytokin verzichtet werden kann. Buxton und Kollegen zeigten unter anderem, dass der Proteoglykangehalt in Hydrogelen nach 42 Tagen Kultivierung gleich hoch ist, unabhängig davon, ob das Medium sieben Tage oder die komplette Zeit 10 ng/ml TGF- β 1 enthielt [227]. Mehlhorn und Kollegen zeigten, dass die Exposition von 60 ng/ml TGF- β 3 für drei Tage ausreicht, um eine chondrogene Differenzierung der Zellen für mindestens weitere elf Tage aufrechtzuerhalten [228]. Es konnte hierbei eine Konzentrationsabhängigkeit des Zytokins und der Qualität der Chondrogenese beobachtet werden. Auch Kisiday und Kollegen zeigten, dass bei der Kultivierung von MSCs des Pferdes in Suspension mit 10 ng/ml TGF- β 3 für drei Tage und anschließender Kultivierung in Agarosegelen die Expression von Chondrozytenmarkern unabhängig davon war, ob TGF- β 3 während der Gelkultivierung zugesetzt wurde oder nicht [80]. Ebenso beschrieben Huang und Kollegen, dass es ausreicht, TGF- β 3 transient zu einer MSC-Pelletkultur des Knochenmarks von Kälbern zu geben, um eine chondrogene Differenzierung zu erhalten [229]. Vermutlich ist es so, dass nach erfolgter Induktion des chondrozytären Phänotyps die Zellen Botenstoffe sezernieren, welche den chondrozytären Phänotyp stabilisieren. In der

Literatur können dazu keine Untersuchungen gefunden werden. Eine Aufrechterhaltung des chondrozytären Phänotyps auch ohne TGF- β -Zugabe von außen bedeutet, dass bei der Implantation der vordifferenzierten Zellen das Zytokin höchstwahrscheinlich nicht mit implantiert werden muss. Dies vermindert die Risiken für Nebenwirkungen und zusätzlich kann auf einen Unbedenklichkeitstest von TGF β während der klinischen Studien verzichtet werden, was eine klinische Zulassung erleichtert.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Hydrogele, wie das hier verwendete Gelatinegel, als Matrix für eine chondrogene Differenzierung von MSCs geeignet sind. Zusätzlich konnte durch Änderungen der Protokolle für die MSC-Isolierung, -Expansion und -Differenzierung der chondrozytäre Phänotyp stabilisiert werden. Hinsichtlich der klinischen Anwendung von MSCs konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Dexamethason für eine chondrogene Differenzierung der Zellen nicht notwendig ist. Auch kann nach erfolgreicher Induktion der Differenzierung mit TGF- β 3 ohne Verlust des chondrozytären Phänotyps auf den Zusatz des Zytokins verzichtet werden. Somit kann das Risiko für Nebenwirkungen im Patienten verringert werden.

Ob die in der vorliegenden Arbeit entwickelten *in vitro* Protokolle auch *in vivo* zu gleichen Resultaten führt, müsste in einem Tierversuch untersucht werden. Auch kann nur in einem Großtierversuch geklärt werden, ob die Nischenbedingungen innerhalb der Bandscheibe geeignet sind, eine *in situ* Differenzierung zu erhalten, oder ob *in vitro* vordifferenzierte MSCs injiziert werden sollten. Für Anwendungen in der Klinik müssen ebenso die Protokolle für die MSC-Expansion in weiteren Arbeiten angepasst werden, da die hier verwendeten z. B. durch zugesetztes FBS nicht für Anwendungen im Menschen geeignet sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits die MSC-Isolierung und -Expansion die Qualität der chondrogenen Differenzierung beeinflussen. Ob hierbei, und auch im späteren Verlauf der Differenzierung, sämtliche MSC-Subpopulationen bereits vordifferenziert werden, oder ob einzelne Subpopulationen nur gefördert und nicht chondrogene z. B. unterdrückt oder apoptotisch werden, sollte ebenfalls noch untersucht werden. Auch ist es notwendig zu untersuchen, ob einzelne MSC-Subpopulationen vor der Implantation eliminiert werden müssen, um eine unerwünschte Differenzierungsrichtung, wie z. B. die osteogene, komplett ausschließen zu können, oder ob vorliegende Nischenbedingungen dies bereits von vorn herein ausschließen. Zusätzlich sollte auch die Funktion von Kollagen Typ X identifiziert werden, da dieses bei der *in vitro* Differenzierung synthetisiert wird. Kollagen Typ X wird als Hypertrophiemarker angesehen und, um einen falschen Differenzierungsphänotyp auszuschließen, sollte diese Hypothese durch weitere Arbeiten überprüft werden.

Insgesamt haben adulte Vorläuferzellen ein sehr großes Potential für Anwendungen in der Regenerationsmedizin, so dass in Zukunft viele therapeutische Anwendungen dieser Zellen zu erwarten sind. Die biologischen Prozesse der Differenzierung wirklich verstehen und diese gezielt und „berechenbar“ verwenden zu können, stellt jedoch für die Forschung noch eine große Herausforderung dar. Wann MSCs klinisch eingesetzt werden können, hängt davon ab, wie schnell die noch offenen Fragen über deren Differenzierungsbiologie beantwortet werden können.

6 REFERENZEN

1. Edwards, R.G. and H.K. Beard, *Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(10): p. 863-905.
2. Dudek, R.W., *BRS Embryology (Board Review)*. 5th ed. 2010: Lippincott Williams&Wilki. 320.
3. Brewe, M., *Embryonenschutz und Stammzellgesetz: Rechtliche Aspekte der Forschung mit embryonalen Stammzellen (Veröffentlichungen Des Instituts Für Deutsches, Europäisches)*. 1st ed. 2006, Berlin: Springer Verlag. 344.
4. Peura, T., et al., *Generation of human embryonic stem cells*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2011. **Chapter 1**: p. Unit1A 5.
5. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
6. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
7. Erdo, F., et al., *Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(7): p. 780-5.
8. Su, W., et al., *Bioluminescence reporter gene imaging characterize human embryonic stem cell-derived teratoma formation*. J Cell Biochem, 2011. **112**(3): p. 840-8.
9. Brederlau, A., et al., *Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation*. Stem Cells, 2006. **24**(6): p. 1433-40.
10. Fujikawa, T., et al., *Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells*. Am J Pathol, 2005. **166**(6): p. 1781-91.
11. *Stammzellgesetz vom 28. Juni 2002 (BGBl. I S. 2277), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 14. August 2008 (BGBl. I S. 1708) geändert worden ist.*
12. *Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746), das durch Artikel 22 des Gesetzes vom 23. Oktober 2001 (BGBl. I S. 2702) geändert worden ist.*
13. Feng, J., et al., *Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6503-8.

-
14. Morris, L.M., et al., *Characterization of endothelial progenitor cells mobilization following cutaneous wounding*. Wound Repair Regen, 2010. **18**(4): p. 383-90.
 15. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. Circ Res, 1999. **85**(3): p. 221-8.
 16. Odorfer, K.I., et al., *Hematopoietic bone marrow cells participate in endothelial, but not epithelial or mesenchymal cell renewal in adult rats*. J Cell Mol Med, 2010.
 17. Lodish, H., et al., *Molecular Cell Biology* 5th ed. 2004: Palgrave Macmillan. 973.
 18. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell* 4th ed. 2002: Taylor & Francis.
 19. Georgii, A., *Histopathology of bone marrow in human chronic leukemias*. Haematol Blood Transfus, 1979. **23**: p. 59-70.
 20. Dormer, P., F. Hegemann, and W. Brinkmann, *Proliferation and production of hemopoietic cells two stages of disease: preleukemia and overt leukemia*. Klin Wochenschr, 1976. **54**(10): p. 461-6.
 21. Sloma, I., et al., *Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia*. Leukemia, 2010. **24**(11): p. 1823-33.
 22. Yin, B.B., et al., *Preliminary screening and identification of stem cell-like sphere clones in a gallbladder cancer cell line GBC-SD*. J Zhejiang Univ Sci B, 2011. **12**(4): p. 256-263.
 23. Mishra, L., et al., *Liver stem cells and hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2009. **49**(1): p. 318-29.
 24. Zou, J., et al., *Proteome of human colon cancer stem cells: A comparative analysis*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(10): p. 1276-85.
 25. Bozzi, F., et al., *High CD133 expression levels in gastrointestinal stromal tumors*. Cytometry B Clin Cytom, 2011.
 26. Lee, J.S., et al., *A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells*. Nat Med, 2006. **12**(4): p. 410-6.
 27. Zhou, X., et al., *Expression of the stem cell marker, nanog, in human endometrial adenocarcinoma*. Int J Gynecol Pathol, 2011. **30**(3): p. 262-70.

-
28. Korbling, M., et al., *Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma*. Blood, 1986. **67**(2): p. 529-32.
 29. Goldman, J.M., et al., *Autografting for chronic granulocytic leukemia*. N Engl J Med, 1981. **305**(12): p. 700.
 30. Korbling, M., et al., *Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia*. Exp Hematol, 1981. **9**(6): p. 684-90.
 31. Gafter-Gvili, A., et al., *Management of aplastic anemia: the role of systematic reviews and meta-analyses*. Acta Haematol, 2011. **125**(1-2): p. 47-54.
 32. Stephan, J.L., et al., *Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients*. J Pediatr, 1993. **123**(4): p. 564-72.
 33. Wobus, A., et al., *Stammzellforschung und Zelltherapie. Stand des Wissens und der Rahmenbedingungen in Deutschland*. 2006, München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag. 295.
 34. Buckley, R.H., et al., *Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency*. N Engl J Med, 1999. **340**(7): p. 508-16.
 35. Mishra, R., et al., *Characterization and functionality of cardiac progenitor cells in congenital heart patients*. Circulation, 2011. **123**(4): p. 364-73.
 36. Clayton, E., et al., *A single type of progenitor cell maintains normal epidermis*. Nature, 2007. **446**(7132): p. 185-9.
 37. Mimeault, M. and S.K. Batra, *Recent advances on skin-resident stem/progenitor cell functions in skin regeneration, aging and cancers and novel anti-aging and cancer therapies*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(1-2): p. 116-34.
 38. Dowthwaite, G.P., et al., *The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 6): p. 889-97.
 39. Karlsson, C. and A. Lindahl, *Articular cartilage stem cell signalling*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(4): p. 121.
 40. Bollini, S., N. Smart, and P.R. Riley, *Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 296-303.

-
41. Conget, P.A. and J.J. Minguell, *Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells*. J Cell Physiol, 1999. **181**(1): p. 67-73.
 42. Rodriguez, A.M., et al., *The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 125-8.
 43. Almeida-Porada, G., E.D. Zanjani, and C.D. Porada, *Bone marrow stem cells and liver regeneration*. Exp Hematol, 2010. **38**(7): p. 574-80.
 44. Huang, G.T., S. Gronthos, and S. Shi, *Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine*. J Dent Res, 2009. **88**(9): p. 792-806.
 45. Zeidan-Chulia, F. and M. Noda, *"Opening" the mesenchymal stem cell tool box*. Eur J Dent, 2009. **3**(3): p. 240-9.
 46. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
 47. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1928-42.
 48. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
 49. Leeper, N.J., A.L. Hunter, and J.P. Cooke, *Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells*. Circulation, 2010. **122**(5): p. 517-26.
 50. Gallay, P., et al., *Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in human serum determines the tumor necrosis factor response of monocytes to LPS*. J Infect Dis, 1994. **170**(5): p. 1319-22.
 51. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
 52. Iwasaki, M., et al., *Regulation of proliferation and osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells by transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor*. J Bone Joint Surg Am, 1995. **77**(4): p. 543-54.
 53. Kadiyala, S., et al., *Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro*. Cell Transplant, 1997. **6**(2): p. 125-34.

-
54. Kopen, G.C., D.J. Prockop, and D.G. Phinney, *Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10711-6.
 55. Munoz-Elias, G., et al., *Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival*. J Neurosci, 2004. **24**(19): p. 4585-95.
 56. Phinney, D.G. and D.J. Prockop, *Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views*. Stem Cells, 2007. **25**(11): p. 2896-902.
 57. Wen, Z., et al., *Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2010.
 58. Lee, R.H., et al., *Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17438-43.
 59. Snykers, S., et al., *Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: in vitro strategies*. Methods Mol Biol, 2011. **698**: p. 305-14.
 60. Nie, C., D. Yang, and S.F. Morris, *Local delivery of adipose-derived stem cells via acellular dermal matrix as a scaffold: a new promising strategy to accelerate wound healing*. Med Hypotheses, 2009. **72**(6): p. 679-82.
 61. Arthur, A., et al., *Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues*. Stem Cells, 2008. **26**(7): p. 1787-95.
 62. Zhang, W., et al., *In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**(2-3): p. 117-25.
 63. Buhning, H.J., et al., *Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1176**: p. 124-34.
 64. Rozemuller, H., et al., *Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting anti-human monoclonal antibodies*. Stem Cells Dev, 2010. **19**(12): p. 1911-21.
 65. Vogel, W., et al., *Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells*. Haematologica, 2003. **88**(2): p. 126-33.

-
66. Battula, V.L., et al., *Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1*. Haematologica, 2009. **94**(2): p. 173-84.
67. Nathanson, M.A., S.R. Hilfer, and R.L. Searls, *Formation of cartilage by non-chondrogenic cell types*. Dev Biol, 1978. **64**(1): p. 99-117.
68. Suhonen, J.O., et al., *Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo*. Nature, 1996. **383**(6601): p. 624-7.
69. Fricker, R.A., et al., *Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain*. J Neurosci, 1999. **19**(14): p. 5990-6005.
70. Minas, T. and S. Nehrer, *Current concepts in the treatment of articular cartilage defects*. Orthopedics, 1997. **20**(6): p. 525-38.
71. Kramer, J., et al., *In vivo matrix-guided human mesenchymal stem cells*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(5): p. 616-26.
72. Noble, B.S., et al., *Dextran sulfate promotes the rapid aggregation of porcine bone-marrow stromal cells*. Bone, 1995. **17**(4): p. 375-82.
73. Denker, A.E., S.B. Nicoll, and R.S. Tuan, *Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1*. Differentiation, 1995. **59**(1): p. 25-34.
74. Johnstone, B., et al., *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Exp Cell Res, 1998. **238**(1): p. 265-72.
75. Kempson, G.E., et al., *The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans*. Biochim Biophys Acta, 1973. **297**(2): p. 456-72.
76. Walmsley, R., *The development and growth of the intervertebral disc*. Edinb Med J, 1953. **60**(8): p. 341-64.
77. Peacock, A., *Observations on the postnatal structure of the intervertebral disc in man*. J Anat, 1952. **86**(2): p. 162-79.
78. Adams, P., D.R. Eyre, and H. Muir, *Biochemical aspects of development and ageing of human lumbar intervertebral discs*. Rheumatol Rehabil, 1977. **16**(1): p. 22-9.
79. Eyre, D.R. and H. Muir, *Types I and II collagens in intervertebral disc. Interchanging radial distributions in annulus fibrosus*. Biochem J, 1976. **157**(1): p. 267-70.

-
80. Melrose, J., et al., *Aggrecan, versican and type VI collagen are components of annular translamellar crossbridges in the intervertebral disc*. Eur Spine J, 2008. **17**(2): p. 314-24.
 81. Martel-Pelletier, J., et al., *Cartilage in normal and osteoarthritis conditions*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2008. **22**(2): p. 351-84.
 82. Moffatt, P., et al., *Hyaluronan production by means of Has2 gene expression in chondrocytes is essential for long bone development*. Dev Dyn, 2011. **240**(2): p. 404-12.
 83. Roughley, P.J., et al., *The Role of Hyaluronan Produced by Has2 Gene Expression in Development of the Spine*. Spine 2011.
 84. Bastow, E.R., et al., *Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(3): p. 395-413.
 85. Schubert, T., et al., *Modulation of cartilage differentiation by melanoma inhibiting activity/cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (MIA/CD-RAP)*. Exp Mol Med, 2010. **42**(3): p. 166-74.
 86. Lefebvre, V., R.R. Behringer, and B. de Crombrughe, *L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9 Suppl A**: p. S69-75.
 87. Cucchiarini, M., et al., *Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(1): p. 158-67.
 88. Boos, N., et al., *Immunolocalization of type X collagen in human lumbar intervertebral discs during ageing and degeneration*. Histochem Cell Biol, 1997. **108**(6): p. 471-80.
 89. Balcerzak, M., et al., *The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(4): p. 1019-38.
 90. Hui, M. and H.C. Tenenbaum, *New face of an old enzyme: alkaline phosphatase may contribute to human tissue aging by inducing tissue hardening and calcification*. Anat Rec, 1998. **253**(3): p. 91-4.
 91. Steck, E., et al., *Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 403-11.
 92. Ebert, J.R., et al., *Clinical and magnetic resonance imaging-based outcomes to 5 years after matrix-induced autologous chondrocyte implantation to address articular cartilage defects in the knee*. Am J Sports Med, 2011. **39**(4): p. 753-63.

-
93. Ochs, B.G., et al., *Remodeling of Articular Cartilage and Subchondral Bone After Bone Grafting and Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation for Osteochondritis Dissecans of the Knee*. Am J Sports Med, 2010.
 94. Matricali, G.A., G.P. Dereymaeker, and F.P. Luyten, *Donor site morbidity after articular cartilage repair procedures: a review*. Acta Orthop Belg, 2010. **76**(5): p. 669-74.
 95. Ruan, D.K., et al., *Experimental intervertebral disc regeneration with tissue-engineered composite in a canine model*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(7): p. 2381-9.
 96. Meisel, H.J., et al., *Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc*. Biomol Eng, 2007. **24**(1): p. 5-21.
 97. Boos, N., et al., *Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science*. Spine, 2002. **27**(23): p. 2631-44.
 98. Haefeli, M., et al., *The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc*. Spine 2006. **31**(14): p. 1522-31.
 99. Maroudas, A., et al., *Factors involved in the nutrition of the human lumbar intervertebral disc: cellularity and diffusion of glucose in vitro*. J Anat, 1975. **120**(1): p. 113-30.
 100. Chujo, T., et al., *Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc--in vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study*. Spine, 2006. **31**(25): p. 2909-17.
 101. An, H.S., et al., *Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits*. Spine 2005. **30**(1): p. 25-31; discussion 31-2.
 102. Miyamoto, K., et al., *Intradiscal injections of osteogenic protein-1 restore the viscoelastic properties of degenerated intervertebral discs*. Spine J, 2006. **6**(6): p. 692-703.
 103. Imai, Y., et al., *Recombinant human osteogenic protein-1 upregulates proteoglycan metabolism of human anulus fibrosus and nucleus pulposus cells*. Spine, 2007. **32**(12): p. 1303-9; discussion 1310.
 104. Kitchel, S.H., M.Y. Wang, and C.L. Laurysen, *Techniques for aspirating bone marrow for use in spinal surgery*. Neurosurgery, 2005. **57**(4 Suppl): p. 286-9; discussion 286-9.

-
105. Le Blanc, K., et al., *HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells*. *Exp Hematol*, 2003. **31**(10): p. 890-6.
 106. Arufe, M.C., et al., *Analysis of the Chondrogenic Potential and Secretome of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Stroma*. *Stem Cells Dev*, 2010.
 107. Sohn, D.H., et al., *Effect of gravity on localization of chondrocytes implanted in cartilage defects*. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(394): p. 254-62.
 108. Le Maitre, C.L., et al., *An in vitro study investigating the survival and phenotype of mesenchymal stem cells following injection into nucleus pulposus tissue*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(1): p. R20.
 109. Hong, S.R., et al., *Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004. **15**(2): p. 201-14.
 110. Maurer, P.H., *Immunochemical comparisons of various gelatins and their derivatives*. *Arch Biochem Biophys*, 1955. **58**(1): p. 205-13.
 111. Broderick, E.P., et al., *Enzymatic stabilization of gelatin-based scaffolds*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005. **72**(1): p. 37-42.
 112. Laurent, T.C. and J.R. Fraser, *Hyaluronan*. *FASEB J*, 1992. **6**(7): p. 2397-404.
 113. *Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S.3394), das zuletzt durch Artikel 7 des Gesetzes vom 22. Dezember 2010 (BGBl. I S. 2262) geändert worden ist*.
 114. Bush, J., et al., *Scar-improving efficacy of avotermin administered into the wound margins of skin incisions as evaluated by a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial*. *Plast Reconstr Surg*, 2010. **126**(5): p. 1604-15.
 115. Occleston, N.L., et al., *Avotermin for the improvement of scar appearance: a new pharmaceutical in a new therapeutic area*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009. **18**(8): p. 1231-9.
 116. Gallay, S.H., et al., *Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro*. *J Orthop Res*, 1994. **12**(4): p. 515-25.
 117. van Beuningen, H.M., et al., *Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint*. *Lab Invest*, 1994. **71**(2): p. 279-90.

-
118. Bakker, A.C., et al., *Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation*. Osteoarthritis and Cartilage, 2001. **9**(2): p. 128-36.
 119. Gore-Hyer, E., et al., *TGF-beta and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(4): p. F707-16.
 120. Border, W.A. and N.A. Noble, *TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy*. Kidney Int, 1997. **51**(5): p. 1388-96.
 121. van Beuningen, H.M., et al., *Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**(1): p. 25-33.
 122. Scharstuhl, A., et al., *Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology*. Stem Cells, 2007. **25**(12): p. 3244-51.
 123. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
 124. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 126-39.
 125. Li, K. and A. Brownley, *RT-PCR Protocols: Second Edition*, in *Methods in Molecular Biology*, N. King, Editor. 2010. p. 271-299
 126. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1559-82.
 127. Sommer, R. and D. Tautz, *Minimal homology requirements for PCR primers*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(16): p. 6749.
 128. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
 129. Finger, F., et al., *Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/12*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(12): p. 3395-403.
 130. Gebhard, P.M., et al., *Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes*. J Orthop Res, 2003. **21**(1): p. 96-101.

-
131. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
 132. Scott, J.E. and J. Dorling, *Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solutions*. Histochemie, 1965. **5**(3): p. 221-33.
 133. Heumann, D., et al., *Radioimmunoassay versus flow cytometric assay to quantify LPS-binding protein (LBP) concentrations in human plasma*. J Immunol Methods, 1994. **171**(2): p. 169-76.
 134. Bauknecht, M.B., Bernard ; Müller, Rolf *Gmünder Ersatzkasse: GEK-Edition ; Bd. 70 in GEK-Bandscheiben-Report : Versorgungsforschung mit GEK-Routinedaten / Maren Bauknecht ; Bernard Braun ; Rolf Müller. [Hrsg.: GEK] 2009.*
 135. Merceron, C., et al., *The effect of two and three dimensional cell culture on the chondrogenic potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells after subcutaneous transplantation with an injectable hydrogel*. Cell Transplant, 2011.
 136. Lin, Y., et al., *Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(4): p. 929-39.
 137. Zhang, X., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue*. J Cell Biochem, 2011. **112**(4): p. 1206-18.
 138. Wang, L., L. Zhao, and M.S. Detamore, *Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med, 2010.
 139. Karystinou, A., et al., *Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48**(9): p. 1057-64.
 140. He, F., X. Chen, and M. Pei, *Reconstruction of an in vitro tissue-specific microenvironment to rejuvenate synovium-derived stem cells for cartilage tissue engineering*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(12): p. 3809-21.
 141. Ichinose, S., et al., *Morphological differences during in vitro chondrogenesis of bone marrow-, synovium-MSCs, and chondrocytes*. Lab Invest, 2010. **90**(2): p. 210-21.

-
142. Karlsen, T.A., et al., *Effect of three-dimensional culture and incubator gas concentration on phenotype and differentiation capability of human mesenchymal stem cells*. J Cell Biochem, 2011. **112**(2): p. 684-93.
 143. Lee, H.J., et al., *Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(8): p. 2325-32.
 144. Steinert, A.F., et al., *Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. R148.
 145. Islam, A., *A new single-use bone marrow biopsy needle*. Biomed Instrum Technol, 2005. **39**(5): p. 391-6.
 146. Swords, R.T., et al., *Rotary powered device for bone marrow aspiration and biopsy yields excellent specimens quickly and efficiently*. J Clin Pathol, 2010. **63**(6): p. 562-5.
 147. Cavallo, C., et al., *Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies*. J Cell Biochem, 2011. **112**(5): p. 1418-30.
 148. Bernardo, M.E., et al., *Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources*. Connect Tissue Res, 2007. **48**(3): p. 132-40.
 149. Garcia-Alvarez, F., et al., *Chondrogenic differentiation in femoral bone marrow-derived mesenchymal cells (MSC) from elderly patients suffering osteoarthritis or femoral fracture*. Arch Gerontol Geriatr, 2011. **52**(2): p. 239-42.
 150. Dickhut, A., et al., *Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage*. J Cell Physiol, 2009. **219**(1): p. 219-26.
 151. Jones, E.A., et al., *Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(12): p. 3349-60.
 152. Yoo, J.U., et al., *The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(12): p. 1745-57.
 153. Bahney, C.S., et al., *A bioresponsive hydrogel tuned to chondrogenesis of human mesenchymal stem cells*. FASEB J, 2011.

-
154. Neumann, K., et al., *BMP7 promotes adipogenic but not osteo-/chondrogenic differentiation of adult human bone marrow-derived stem cells in high-density micro-mass culture*. J Cell Biochem, 2007. **102**(3): p. 626-37.
 155. Bobick, B.E., R.S. Tuan, and F.H. Chen, *The intermediate filament vimentin regulates chondrogenesis of adult human bone marrow-derived multipotent progenitor cells*. J Cell Biochem, 2010. **109**(1): p. 265-76.
 156. Nelea, V., et al., *Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma*. J Biomed Mater Res A, 2005. **75**(1): p. 216-23.
 157. Shen, B., et al., *BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(6): p. 1311-20.
 158. Perez-Illzarbe, M., et al., *Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy*. Transfusion, 2009. **49**(9): p. 1901-10.
 159. Battula, V.L., et al., *Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation*. Differentiation, 2007. **75**(4): p. 279-91.
 160. Bieback, K., et al., *Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow*. Stem Cells, 2009. **27**(9): p. 2331-41.
 161. Hellingman, C.A., et al., *Fibroblast growth factor receptors in in vitro and in vivo chondrogenesis: relating tissue engineering using adult mesenchymal stem cells to embryonic development*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(2): p. 545-56.
 162. Tuli, R., et al., *Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 41227-36.
 163. Mueller, M.B. and R.S. Tuan, *Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(5): p. 1377-88.
 164. Caplan, A.I.T.-L.R., *The mesengenic process*. Clin Plast Surg, 1994. **21**(3): p. 429-35.
 165. Chase, L.G., et al., *A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2010. **1**(1): p. 8.

-
166. Ng, F., et al., *PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages*. *Blood*, 2008. **112**(2): p. 295-307.
167. Shahdadfar, A., et al., *In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability*. *Stem Cells*, 2005. **23**(9): p. 1357-66.
168. Castle, P. and J.S. Robertson, *Animal sera, animal sera derivatives and substitutes used in the manufacture of pharmaceuticals*. 5-6 May 1998, *Strasbourg, France*. *Biologicals*, 1998. **26**(4): p. 365-8.
169. Felka, T., et al., *Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells*. *Cytotherapy*, 2010. **12**(2): p. 143-53.
170. Horn, P., et al., *Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells*. *Cytotherapy*, 2010. **12**(7): p. 888-98.
171. Schallmoser, K., et al., *Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2008. **14**(3): p. 185-96.
172. Schallmoser, K., et al., *Platelet-derived growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells*. *Biomed Mater Eng*, 2009. **19**(4-5): p. 271-6.
173. Crescenzi, V., A. Francescangeli, and A. Taglienti, *New gelatin-based hydrogels via enzymatic networking*. *Biomacromolecules*, 2002. **3**(6): p. 1384-91.
174. Oegema, T.R., Jr., *Biochemistry of the intervertebral disc*. *Clin Sports Med*, 1993. **12**(3): p. 419-39.
175. Urban, J.P., S. Smith, and J.C. Fairbank, *Nutrition of the intervertebral disc*. *Spine*, 2004. **29**(23): p. 2700-9.
176. Liebscher, T., et al., *Age-related variation in cell density of human lumbar intervertebral disc*. *Spine* 2011. **36**(2): p. 153-9.
177. Buckwalter, J.A., *Aging and degeneration of the human intervertebral disc*. *Spine* 1995. **20**(11): p. 1307-14.
178. Trout, J.J., J.A. Buckwalter, and K.C. Moore, *Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus*. *Anat Rec*, 1982. **204**(4): p. 307-14.

-
179. Shi, B., et al., *Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(14): p. 5105-19.
 180. Thome, C., et al., *Outcome after lumbar sequestrectomy compared with microdiscectomy: a prospective randomized study*. J Neurosurg Spine, 2005. **2**(3): p. 271-8.
 181. Noth, U., et al., *Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels*. J Biomed Mater Res A, 2007. **83**(3): p. 626-35.
 182. Zheng, L., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based hydrogel: an in vivo study*. J Biomed Mater Res A, 2010. **93**(2): p. 783-92.
 183. Dickhut, A., et al., *Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4517-28.
 184. Kuwahara, K., et al., *Cell delivery using an injectable and adhesive transglutaminase-gelatin gel*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. **16**(4): p. 609-18.
 185. Fink, T., et al., *Instability of standard PCR reference genes in adipose-derived stem cells during propagation, differentiation and hypoxic exposure*. BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 98.
 186. Wang, Y., et al., *Evaluation of suitable reference gene for real-time PCR in human umbilical cord mesenchymal stem cells with long-term in vitro expansion*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(7): p. 595-9.
 187. Curtis, K.M., et al., *EF1alpha and RPL13a represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells*. BMC Mol Biol, 2010. **11**: p. 61.
 188. McCanless, J.D., et al., *Modeling Nucleus Pulposus Regeneration In Vitro: Mesenchymal Stem Cells, Alginate Beads, Hypoxia, BMP-2, and Synthetic Peptide B2A*. Spine 2011.
 189. Mohan, N. and P.D. Nair, *A synthetic scaffold favoring chondrogenic phenotype over a natural scaffold*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(2): p. 373-84.
 190. Wang, D.W., et al., *Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells*. J Cell Physiol, 2005. **204**(1): p. 184-91.
 191. Lei, M., S.Q. Liu, and Y.L. Liu, *Resveratrol protects bone marrow mesenchymal stem cell derived chondrocytes cultured on chitosan-gelatin scaffolds from the inhibitory effect of interleukin-1beta*. Acta Pharmacol Sin, 2008. **29**(11): p. 1350-6.

-
192. Vach, B., et al., *[Infiltration of local anesthetics into the thyroid gland capsule for surgery and the postoperative period]*. Rozhl Chir, 2002. **81**(10): p. 519-22.
193. Cullinane, A.R., et al., *Corrigendum: Mutations in VIPAR cause an arthrogyriposis, renal dysfunction and cholestasis syndrome phenotype with defects in epithelial polarization*. Nat Genet, 2011. **43**(3): p. 277.
194. Cullinane, A.R., et al., *Mutations in VIPAR cause an arthrogyriposis, renal dysfunction and cholestasis syndrome phenotype with defects in epithelial polarization*. Nat Genet, 2010. **42**(4): p. 303-12.
195. Gosselin, L.E., et al., *Effect of exercise training on passive stiffness in locomotor skeletal muscle: role of extracellular matrix*. J Appl Physiol, 1998. **85**(3): p. 1011-6.
196. Mwale, F., et al., *Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation*. J Orthop Res, 2006. **24**(8): p. 1791-8.
197. Steck, E., et al., *Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(7): p. 969-78.
198. Zhang, L., et al., *Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(9): p. 1339-46.
199. Kim, H.J., Y.J. Kim, and G.I. Im, *Is continuous treatment with transforming growth factor-beta necessary to induce chondrogenic differentiation in mesenchymal stem cells?* Cells Tissues Organs, 2009. **190**(1): p. 1-10.
200. Meyer, E.G., et al., *Low oxygen tension is a more potent promoter of chondrogenic differentiation than dynamic compression*. J Biomech, 2010. **43**(13): p. 2516-23.
201. Scott, D., et al., *Concentration dependence of interstitial flow buffering by hyaluronan in synovial joints*. Microvasc Res, 2000. **59**(3): p. 345-53.
202. Presti, D. and J.E. Scott, *Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH.) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass*. Cell Biochem Funct, 1994. **12**(4): p. 281-8.
203. Bosnakovski, D., et al., *Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis*. Biotechnol Bioeng, 2006. **93**(6): p. 1152-63.

-
204. Calderon, L., et al., *Type II collagen-hyaluronan hydrogel--a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering*. Eur Cell Mater, 2010. **20**: p. 134-48.
205. Erickson, I.E., et al., *Differential maturation and structure-function relationships in mesenchymal stem cell- and chondrocyte-seeded hydrogels*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(5): p. 1041-52.
206. Jakobsen, R.B., et al., *Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18**(10): p. 1407-16.
207. Ho, S.T., et al., *The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells*. Biomaterials, 2010. **31**(1): p. 38-47.
208. Benz, K., et al., *A polyethylene glycol-crosslinked serum albumin/hyaluronan hydrogel for the cultivation of chondrogenic cell types*. Advanced Engineering Materials, 2010. **12**(9): p. B539-551.
209. Diekman, B.O., B.T. Estes, and F. Guilak, *The effects of BMP6 overexpression on adipose stem cell chondrogenesis: Interactions with dexamethasone and exogenous growth factors*. J Biomed Mater Res A, 2010. **93**(3): p. 994-1003.
210. Miyazaki, Y., et al., *Dexamethasone inhibition of TGF beta-induced cell growth and type II collagen mRNA expression through ERK-integrated AP-1 activity in cultured rat articular chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2000. **8**(5): p. 378-85.
211. Weiss, A., E. Livne, and M. Silbermann, *Glucocorticoid hormone adversely affects the growth and regeneration of cartilage in vitro*. Growth Dev Aging, 1988. **52**(2): p. 67-75.
212. Holm, S., et al., *Nutrition of the intervertebral disc: solute transport and metabolism*. Connect Tissue Res, 1981. **8**(2): p. 101-19.
213. Bartels, E.M., et al., *Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain*. Spine 1998. **23**(1): p. 1-7; discussion 8.
214. Xu, Y., et al., *In vitro expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis*. Tissue Eng, 2007. **13**(12): p. 2981-93.
215. Hardingham, T.E., R.A. Oldershaw, and S.R. Tew, *Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis*. J Anat, 2006. **209**(4): p. 469-80.

-
216. Lefebvre, V. and B. de Crombrugge, *Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation*. Matrix Biol, 1998. **16**(9): p. 529-40.
217. Grayson, W.L., et al., *Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(3): p. 948-53.
218. Malladi, P., et al., *Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(4): p. C1139-46.
219. Khan, W.S., et al., *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells express the pericyte marker 3G5 in culture and show enhanced chondrogenesis in hypoxic conditions*. J Orthop Res, 2010. **28**(6): p. 834-40.
220. Felka, T., et al., *Hypoxia reduces the inhibitory effect of IL-1beta on chondrogenic differentiation of FCS-free expanded MSC*. Osteoarthritis Cartilage, 2009. **17**(10): p. 1368-76.
221. Kanichai, M., et al., *Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha*. J Cell Physiol, 2008. **216**(3): p. 708-15.
222. Markway, B.D., et al., *Enhanced Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Low Oxygen Environment Micropellet Cultures*. Cell Transplant, 2010. **19**(1): p. 29-42.
223. Videman, T., et al., *Determinants of the progression in lumbar degeneration: a 5-year follow-up study of adult male monozygotic twins*. Spine 2006. **31**(6): p. 671-8.
224. Kurth, T., et al., *Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15**(10): p. 1178-89.
225. Awad, H.A., et al., *Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells*. Tissue Eng, 2003. **9**(6): p. 1301-12.
226. Park, S.H., et al., *Chondrogenesis of rabbit mesenchymal stem cells in fibrin/hyaluronan composite scaffold in vitro*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(9-10): p. 1277-86.
227. Buxton, A.N., et al., *Temporal exposure to chondrogenic factors modulates human mesenchymal stem cell chondrogenesis in hydrogels*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(3-4): p. 371-80.

228. Mehlhorn, A.T., et al., *Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture*. Tissue Eng, 2006. **12**(6): p. 1393-403.
229. Horadagoda, N.U., et al., *Identification of lipopolysaccharide binding protein-like activity in bovine serum*. Biochem Soc Trans, 1994. **22**(3): p. 329S.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Folgende Veröffentlichungen wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit angefertigt:

Beiträge in Fachzeitschriften

Benz K, Freudigmann C, Müller J, Wurst H, Albrecht D, Badke A, Gaissmaier C, Mollenhauer J. A polyethylene glycol-crosslinked serum albumin / hyaluronan hydrogel for the cultivation of chondrogenic cell types. *Advanced Biomaterials* 2010 Sep; 12(9):B539-B551

Müller J, Benz K, Ahlers M, Gaissmaier C, Mollenhauer J. Hypoxic conditions during expansion culture prime human mesenchymal stromal precursor cells for chondrogenic differentiation in 3-dimensional cultures. *Cell Transplantation* 2011 Mar; DOI: 10.3727/096368910X564094

Kongressbeiträge

Poster

10/2008 Biostar (Stuttgart). Chondrogenic bone marrow stem cell differentiation is possible in hydrogels at low cell density. Müller, J; Benz, K; Ahlers, M; Scharstuhl, A; Mollenhauer, J [BioStar 2008–Science in Exchange Meeting Abstracts, Tissue Engineering Part A. March 2009, 15(3): 675-737]

10/2008 Biostar (Stuttgart). Is oxygen a factor for influencing chondrogenic differentiation of bone marrow stem cells? Müller, J; Benz, K; Ahlers, M; Scharstuhl, A; Mollenhauer, J [BioStar 2008–Science in Exchange Meeting Abstracts, Tissue Engineering Part A. March 2009, 15(3): 675-737]

03/2009 ORS (Las Vegas). Is oxygen a factor for influencing chondrogenic differentiation of bone marrow stem cells? Müller, J; Benz, K; Ahlers, M; Scharstuhl, A; Mollenhauer, J [J. Trans Orthop Res Soc. 2009, 34, 0938]

10/2009 4th world congress on regenerative medicine (Leipzig). Hypoxia improves chondrogenesis of MSCs in gelatin hydrogels. Müller, J; Benz, K; Ahlers, M; Mollenhauer, J [World conference on regenerative medicine. Regen Med. 2009, Volume 4, Issue 6, Suppl. 2: S155-S306]

11/2009 Combined Meeting of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT (Hannover). Effect of hypoxia on chondrogenic differentiation of human bone marrow MSCs in hydrogels. Müller, J; Benz, K; Ahlers, M; Mollenhauer, J [ESGC, DGGT, GSZ, and ISCT 2009 poster presentations, Human Gene Therapy. November 2009, 20(11): 1417-1545.]

03/2010 ORS (New Orleans). A model for the preparation of chondrogenically differentiated MSCs in regenerative disc therapy. Mueller, J; Gaiser, C; Benz, K; Ahlers, M; Mollenhauer, J [J. Trans Orthop Res Soc. 2010, 35, 1304]
(Stipendium: Reinhold-und-Maria-Teufel-Stiftung Tuttlingen, Germany)

10/2010 Biostar (Stuttgart). Human bone marrow CD271+W5C5+CD56+ cells are enriched for progenitors with increased chondrocyte differentiation potential. Sobiesiak, M; Müller, J; Cerabona, F; Grimm, S; Benz, K; Bühring H-J [Tissue Engineering Part A. February 2011, 17(3-4): 531-584]

10/2010 Biostar (Stuttgart). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal precursor cells (MSCs) in the absence of dexamethasone. Müller, J; Gaiser, C; Benz, K; Mollenhauer, J [Tissue Engineering Part A. February 2011, 17(3-4): 531-584]

04/2011 Annual meeting of the DGBF (Köln). A hydrogel support for cells in intervertebral disc repair approaches. Müller, J; Benz, K; Mollenhauer, J

Vortrag

04/2011 Annual meeting of the DGBF (Köln). A hydrogel support for cells in intervertebral disc repair approaches