

AUS DER ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE

Prof. Dr. med. Michael Nerlich

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS VON STEROIDHORMONEN AUF DIE
PROLIFERATION UND CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG
VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN**

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Ehehalt
aus München

2011

AUS DER ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE

Prof. Dr. med. Michael Nerlich

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EINFLUSS VON STEROIDHORMONEN AUF DIE
PROLIFERATION UND CHONDROGENE DIFFERENZIERUNG
VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN**

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Ehehalt
aus München

2011

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Angele
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Arthrose – eine degenerative Gelenkerkrankung	8
1.1.1. Epidemiologie von Gelenkknorpelschäden	8
1.1.2. Morphologie des Gelenkknorpels	9
1.1.3. Pathophysiologie der Arthrose	10
1.1.4. Chirurgische Therapie von Gelenkknorpeldefekten	10
1.1.4.1. Therapieziele	10
1.1.4.2. Gelenk lavage und Débridement	11
1.1.4.3. Knochenmarkstimulierende Techniken	11
1.1.4.4. Transplantationstechniken	12
1.2. Tissue Engineering in der Knorpelforschung	13
1.2.1. Allgemeines	13
1.2.2. Mesenchymale Stammzellen	14
1.2.2.1. Isolierung und Kultivierung von MSCs	14
1.2.2.2. Differenzierung zu Chondrozyten	15
1.3. Sexualhormone	16
1.3.1. Östrogen und Arthrose	16
1.3.2. Synthese und Funktion von Sexualhormonen	16
1.3.2.1. Androgene	16
1.3.2.2. Östrogen	17
1.3.2.3. Steroidhormonrezeptoren	18
1.3.3. Hormonsensitivität von Chondrozyten	18
1.4. Motivation dieser Arbeit	19
2. Fragestellung	20

3. Material und Methodik	21
3.1. Material	21
3.1.1. Chemikalien.....	21
3.1.2. Verbrauchsmaterial	23
3.1.3. Geräte	24
3.1.4. Puffer und Lösungen	25
3.2. Methodik	28
3.2.1. Überblick über Versuchsaufbau und Patientenkollektiv	28
3.2.2. Proliferation von mesenchymalen Stammzellen	29
3.2.2.1. Zellentnahme im OP	29
3.2.2.2. Gewinnung mononukleärer Zellen.....	29
3.2.2.3. Proliferation in Monolayerkultur	30
3.2.2.4. Zellauszählung.....	31
3.2.3. Fluoreszenzmessungen	32
3.2.3.1. Resazurinreduktionstest	32
3.2.3.2. Lebend- Tot- Färbung	33
3.2.3.3. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	34
3.2.4. Differenzierung zu Chondrozyten.....	35
3.2.4.1. Differenzierung in der 3D-Kultur	35
3.2.4.2. Fixierung zur histologischen Auswertung	36
3.2.4.3. Anfertigung von histologischen Schnitten.....	36
3.2.4.4. DMMB-Färbung (Methylenblau)	37
3.2.4.5. Immunhistochemische Färbungen.....	37
3.2.4.6. Kollagen Typ II - Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	39
3.2.4.7. DNA- Bestimmung	41
3.2.5. Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Proliferationsphase	42
4.1.1. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	42
4.1.2. Resazurinreduktionstest.....	44
4.1.3. Zellauszählung	48

4.2. Differenzierungsphase	50
4.2.1. Makroskopie und DMMB- Färbung	50
4.2.2. Immunhistochemie für Kollagen Typ II	50
4.2.3. DNA- Bestimmung und Kollagen Typ II ELISA	52
4.2.4. Hormonrezeptoren	54
5. Diskussion.....	55
6. Zusammenfassung	64

Abkürzungsverzeichnis

Erklärung

Danksagung

1. Einleitung

1.1. Arthrose – eine degenerative Gelenkerkrankung

1.1.1. Epidemiologie von Gelenkknorpelschäden

Arthrose gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen im Alter. Man geht davon aus, dass die Mehrheit der Bevölkerung in einem Alter von über 65 Jahren radiologische oder klinische Zeichen von Gelenkknorpeldefekten aufweist. Mehr als 40% der über 70- jährigen leiden an einer Gonarthrose, davon sind ein Viertel der Betroffenen durch Symptome wie Schmerzen, Gelenksteifigkeit und Verlust von Mobilität in den Aktivitäten des täglichen Lebens stark eingeschränkt [1]. Aber auch in der Altersgruppe der 35- bis 55- jährigen weisen ungefähr 5% eine Gonarthrose meist aufgrund traumatischer Genese auf [2]. Dadurch entstehen hohe Kosten für das Gesundheitssystem: Das statistische Bundesamt gibt für das Jahr 2002 Kosten für die Behandlung von muskuloskelettalen Krankheiten in Höhe von 25,2 Milliarden Euro und damit 11,3% der gesamten direkten Krankheitskosten an. Davon entfallen allein 7,2 Milliarden Euro auf die Behandlung der Arthrose. Ein Großteil der Gesamtkosten fällt hierbei bei den über 65- jährigen Patienten an, die Mehrheit davon (73%) ist weiblich [3].

Vielfältige Faktoren tragen zur Entstehung der Arthrose bei. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass genetische Faktoren eine bedeutende Rolle spielen. Dabei handelt es sich um verschiedene Gene, die unter anderem für den Vitamin D Rezeptor, den Insulin like growth factor und diverse Knorpelmatrixproteine kodieren [4]. Des Weiteren fördern ungünstige mechanische Bedingungen, die auf die Gelenkfläche wirken, den Verschleiß des Gelenkknorpels. So konnte gezeigt werden, dass sich die ungleiche Belastung nach kompletten Meniskusresektionen negativ auf die Biomechanik des Kniegelenks auswirkt und damit ein höheres Risiko für Arthrose darstellt als die Meniskusteilresektion [5]. In diesem Zusammenhang gehören auch Gelenkinstabilität, Gelenkfehlstellungen und Adipositas zum Risikoprofil eines Arthrosepatienten. Trotzdem bleibt neben einem weiblichen Genotyp der

wichtigste Auslöser der Alterungsprozess, der sowohl die extrazelluläre Matrix, als auch die biologischen Funktionen des Chondrozyten selbst in Mitleidenschaft zieht [4].

1.1.2. Morphologie des Gelenkknorpels

Die Gelenkflächen echter Gelenke, so genannter Diarthrosen, sind mit hyalinem Knorpel überzogen, der sich aus Chondrozyten und einer extrazellulären Knorpelmatrix zusammensetzt. Knorpelgewebe ist zellarm, so dass nur 2% des Knorpelvolumens eines Erwachsenen aus Chondrozyten besteht. Die Zellzahl ist in der Wachstumsphase von Kleinkindern höher und nimmt mit dem Alter kontinuierlich ab [6].

Chondrozyten besitzen nur eine eingeschränkte Stoffwechselaktivität und sind weder gut durchblutet noch innerviert, jedoch sensitiv für mechanische Stimuli sowie für den Einfluss von Wachstumsfaktoren. Als Energiequelle für die Aufrechterhaltung von Membranfunktionen und die Synthese von Kollagen und Proteoglykanen dient Glukose, die unter niedrigem Sauerstoffangebot verstoffwechselt wird. In tieferen Knorpelschichten steht für den Chondrozyten nur noch 1% Sauerstoff zur Verfügung – in diesem hypoxischen Bereich sorgt führend der Hypoxia Inducible Factor 1α (HIF-1α) für die Aufrechterhaltung des Zellmilieus.

Die Extrazelluläre Matrix besteht aus einem Kollagennetzwerk, an dem Kollagen Typ II- Fibrillen mit Kollagen Typ IX und XI interagieren und so ein Gerüst für die Proteoglykane schaffen [7]. Die zentrale Struktur der Proteoglykane ist eine Hyaluronsäurekette, an die Glykosaminoglykane wie Keratansulfat und Chondroitinsulfat binden. Dabei handelt es sich um negativ geladene Polypeptidketten, die durch Hydratisierung aufquellen. Diese biochemische Zusammensetzung verleiht dem hyalinen Knorpel seine besonderen Eigenschaften. Aus einzelnen Fibrillen zusammengelagerte Kollagenfasern bestimmen deren Reißfestigkeit, Proteoglykane sorgen für eine Stoßdämpferwirkung und zahlreiche andere Proteine steuern die Interaktionen zwischen Zelle und Matrix [6].

1.1.3. Pathophysiologie der Arthrose

Neben strukturellen Veränderungen an der Gelenkknorpelfläche sind bei arthrotischen Gelenken auch Knochen, Synovia und angrenzendes Bindegewebe betroffen. Mit der Knorpelschicht nimmt die Weite des Gelenkspaltes ab, am Gelenkrand bilden sich osteophytäre Randanbauten und der Knochen erfährt gelenknah eine zystenartig Auflockerung [4, 8, 9].

Ursprünglich dachte man, Arthrose folge einem passiven Destruktionsprozess als Antwort auf die anhaltende Belastung der Gelenke. Mittlerweile ist man der Ansicht, dass die sonst als stoffwechselträge bezeichneten Chondrozyten auf mechanische Belastung mit einem Anstieg ihres Metabolismus reagieren und somit im Zentrum der Arthroseentstehung stehen [10]. Biomechanische und metabolische Faktoren bewirken ein Zusammenbrechen der Kommunikation zwischen Zelle und Extrazellulärsubstanz, eine Interaktion, die normalerweise durch Integrine an der Zelloberfläche aufrechterhalten wird. Durch Expression abnormaler Integrine entsteht ein Ungleichgewicht zwischen der Synthese kataboler und anaboler Produkte. Die Zytokine IL-1 und TNF α aktivieren die chondrogene Produktion von Metalloproteininasen (MMPs), die für den enzymatischen Abbau der Knorpelmatrix sorgen. Eine Gegenregulation durch Metalloproteinaseinhibitoren (TIMPs) ist im arthrotischen Knorpel stark vermindert [11]. Durch diese Dysregulation baut der Chondrozyt seine eigene Matrix ab. Zum völligen Zusammenbruch der Homöostase im Gelenk kommt es, wenn Knochenabbauprodukte in die Synovialflüssigkeit gelangen und eine dortige Entzündungsreaktion durch inflammatorische Zytokine den Knorpelmatrixabbau weiter vorantreibt [10].

1.1.4. Chirurgische Therapie von Gelenkknorpeldefekten

1.1.4.1. Therapieziele

Vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung und des hohen Anspruchs an Mobilität und sportliche Aktivität der Bevölkerung bis ins hohe Alter stellen Knorpelschäden ein verbreitetes Problem dar. Zur Linderung der Beschwerden und zur

Prävention einer sekundären Arthrose wird eine frühzeitige Behandlung von Knorpeldefekten angestrebt [12].

Die fortgeschrittene Panarthrose bei älteren Patienten ist eine Domäne der Endoprothetik. Bereits im jungen Alter auftretende Knorpelschäden basieren meist auf traumatischer Genese beispielsweise als Folge von Sportunfällen in Kontaktsportarten. Fokale Knorpeldefekte bilden das Korrelat auf Gelenksebene. Bei diesen Patienten sind Alternativen zur endoprothetischen Therapie, die lediglich eine finale Therapieoption darstellt, zu suchen [13]. Folgende chirurgische Möglichkeiten stehen zur Verfügung:

1.1.4.2. Gelenklavage und Débridement

Eine arthroskopische Gelenklavage mit mechanischem Débridement stellt die chirurgische Basisbehandlung bei arthroskopischen Knorpeleingriffen dar. Langzeitstudien haben jedoch gezeigt, dass sich durch dieses Verfahren die Beschwerden nur vorübergehend bessern, da Entzündungsmediatoren zwar entfernt werden, ein Fortschreiten der Arthrose aber nicht verhindert werden kann [14]. Somit bringt dieses Verfahren vor allem bei älteren Patienten mit manifester Arthrose Schmerzlinderung [15], für die Behandlung fokaler Defekte beim jungen Patienten eignet es sich nur bedingt [12].

1.1.4.3. Knochenmarkstimulierende Techniken

Bei knochenmarkstimulierenden Techniken wird der vaskularisierte Knochen eröffnet, so dass pluripotente Zellen mit Potenz zur Chondrogenese aus dem Knochenmark in den Defektbereich einwandern können. Dort bildet sich zunächst ein Fibringeflecht, aus dem faserartiger Ersatzknorpel entsteht. Man unterscheidet folgende chirurgische Techniken:

Die älteste ist die Pridie- Bohrung, bei der die subchondrale Lamelle aufgebohrt wird. Weil sich durch die dabei entstehende Hitze Nekrosen bilden können, wird diese Technik heute nur noch zur Behandlung von sehr kleinen ($<1\text{cm}^2$) und tiefen Defekten angewandt [12].

Eine weitere Technik, bei der man die Hitzeentwicklung des Bohrens umgeht, ist die Mikrofrakturierung nach Steadman: Nach arthroskopischem Débridement wird der Knochen mithilfe einer dornbesetzten Ahle perforiert. Ein weiterer positiver Effekt dabei ist das Aufrauen der Unterfläche, wodurch der Regeneratknorpel besser adhären kann [16]. Die besten Behandlungsergebnisse zeigten sich bei jungen Patienten mit isolierten Defekten im Bereich der Femurkondylen [17].

Einen ähnlichen Ansatz bietet die Abrasions- Arthroplastik nach Johnson: Dabei wird der erkrankte Knorpel mittels eines Shavers entfernt. Diese Operation stellt aber nur eine palliative Möglichkeit für Patienten mit fortgeschrittener Arthrose dar, die eine Alternative zur Endoprothese suchen [18].

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Vorteil dieser Verfahren in den zufrieden stellenden Kurzzeitergebnissen, der Nachteil in der ausbleibenden Bildung von funktionsfähigem, vollwertigem Knorpel liegt.

1.1.4.4. Transplantationstechniken

Bei der Perichondrium- und Periostlappentransplantation soll die Bedeckung des Knorpeldefekts die Bildung von hyalinem Ersatzknorpel induzieren. Die Ergebnisse waren jedoch nicht zufrieden stellend, so dass diese Technik sich nicht durchsetzen konnte [19].

Ein weiteres Verfahren, das sich mittlerweile fest etabliert hat, ist die Transplantation osteochondraler Autografts. Aus gering belasteten, unbeschädigten Gelenkanteilen werden osteochondrale Zylinder mit einer Hohlfräse oder Hohlstanze entnommen und in das Defektareal implantiert. Kleine bis mittelgroße Defekte lassen sich so gut

sanieren. Größere Knorpeldefekte eignen sich nicht, da hierbei eine zunehmende Entnahmemorbidität einsetzt [20].

Seit 1994 steht mit der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) nach Brittberg ein zellbasiertes Knorpeltherapieverfahren zur Verfügung. Dem Patienten wird eigenes Knorpelgewebe entnommen, woraus Knorpelzellen im Labor herausgelöst und vermehrt und in das débridierte Defektareal implantiert werden. In der ursprünglichen Technik erfolgte zur Stabilisierung der Zellen im Defektbereich eine Abdeckung mit Periostlappen [21]. Dieses Verfahren zeigt hinsichtlich der biomechanischen Belastbarkeit des Regenerates gute Ergebnisse. Der Entstehung von Hypertrophie und Kalzifikationen des Regeneratknorpels wurde in einer Modifizierung der ursprünglichen Methode durch Verwendung von Kollagenmembranen an Stelle des Periostlappens entgegengewirkt. Eine weitere Verfeinerung dieser Technik verwendet Matrices verschiedener Trägersubstanzen, um den Chondrozyten eine optimale dreidimensionale Differenzierungsgrundlage zu bieten. Histologisch zeigt sich bei der ACT ein dauerhaft besseres Regenerat als bei der Mikrofraktionierung [12].

1.2. **Tissue Engineering in der Knorpelforschung**

1.2.1. **Allgemeines**

Tissue Engineering ist ein viel versprechender Forschungszweig, der es sich zur Aufgabe gemacht hat, Körperzellen zu isolieren, unter Zellkulturbedingungen zu expandieren und sie dem Spender zu replantieren, um dadurch beschädigtes Gewebe ersetzen zu können. Ausgangszellen dafür stellen oft mesenchymale Stammzellen (MSCs) dar. Diese multipotenten Vorläuferzellen werden zumeist aus dem Knochenmark gewonnen. Alternative Quellen sind die Plazenta, die Nabelschnur und immer mehr in den klinischen Fokus rückend das menschliche Fettgewebe. Diese Zellen können zu verschiedenen Gewebearten wie Muskel, Sehne, Fett, Knochen und Knorpel differenziert werden [22].

Ziel in der Knorpelforschung ist es, einen Ersatzknorpel herzustellen, der den biomechanischen Herausforderungen genügt. Der Vorteil bei der Verwendung von MSCs

im Gegensatz zur ACT liegt daran, dass kein gesundes Gewebe entnommen werden muss.

Knorpelgewebe selbst zeigt kaum effektive Reparatureigenschaften und ist nicht in der Lage, vorhandene Progenitorzellen zur Defektheilung suffizient aus dem Blut zu rekrutieren. Ein Hauptziel der aktuellen Forschung ist die Proliferation von MSCs zu steuern, die chondrogene Differenzierung zu stimulieren und die klinische Einsetzbarkeit von differenzierten MSCs zu überprüfen [23].

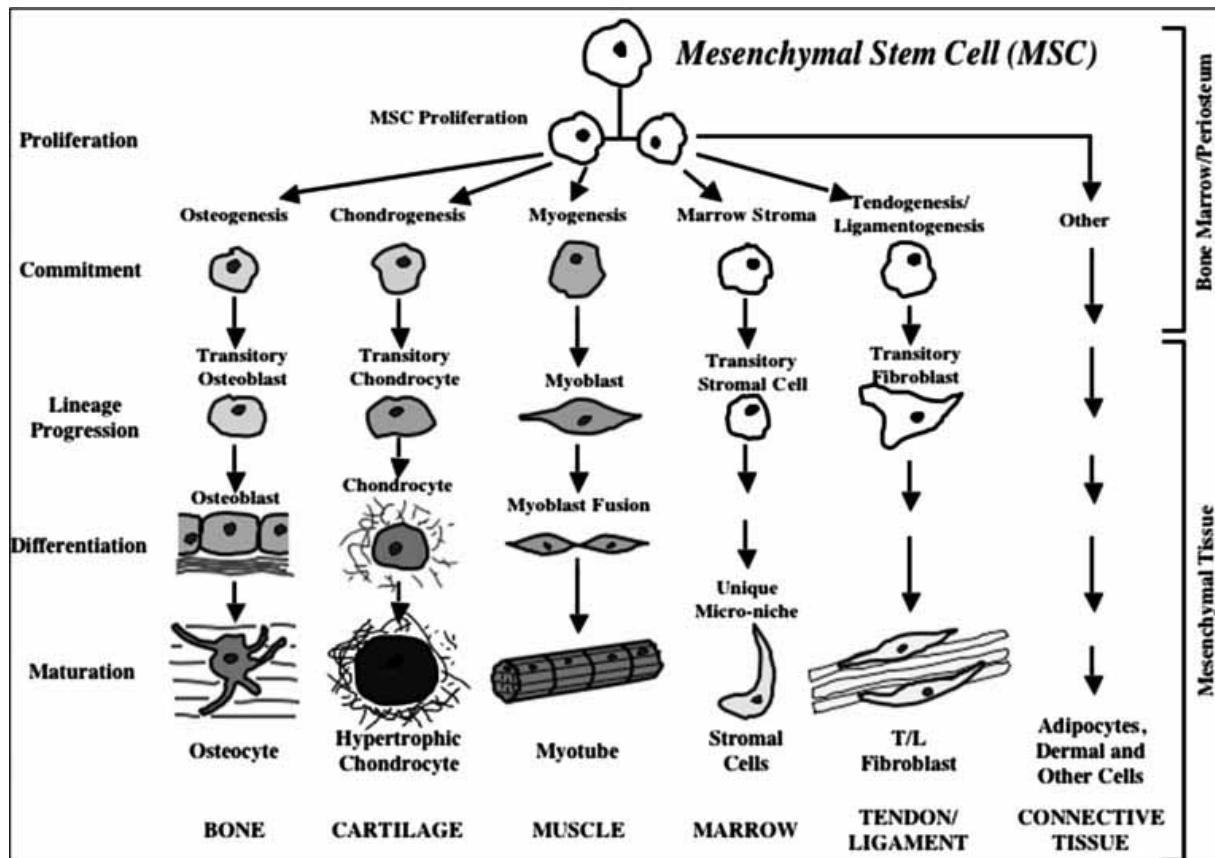


Abbildung 1: Differenzierungskapazität von mesenchymalen Stammzellen [23]

1.2.2. Mesenchymale Stammzellen

1.2.2.1. Isolierung und Kultivierung von MSCs

Mesenchymale Stammzellen sind pluripotent – sie können sich in verschiedene Bindegewebsarten differenzieren. Diese Differenzierungsfähigkeit behalten sie über vie-

le Generationen bei, so dass es einfach ist in relativ kurzer Zeit viele Stammzellen zu kultivieren. MSCs können durch Punktion des Beckenkamms aus menschlichem Knochenmark gewonnen werden. Ihre Isolierung erfolgt meist einfach und effektiv mittels Percollgradienten [24].

MSCs ähneln morphologisch Fibroblasten und heften sich am Zellkulturflaschenboden an bevor sie nach 5-7 Tagen Kolonien bilden. Insgesamt stellen MSCs nur einen sehr geringen Prozentsatz von 0,001% bis 0,1% der gewonnenen mononukleären Zellen dar. Durch definierte Medien können ungewünschte hämatopoetische Vorläuferzellen aufgrund ihrer fehlenden Hafteigenschaft aussortiert werden.

Ein einheitlicher Oberflächenmarker für mesenchymale Stammzellen existiert nicht, jedoch gibt ein Zusammenspiel von verschiedenen immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen Aufschluss darüber, ob tatsächlich MSCs kultiviert wurden. Unter anderem sind MSCs positiv für CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 und negativ für CD14, CD34 und CD45, welche Marker für das hämatopoetische System darstellen [25].

1.2.2.2. Differenzierung zu Chondrozyten

Für die chondrogene Differenzierung gibt es im Wesentlichen drei nötige Voraussetzungen: Den Zellen muss ein dreidimensionales Kulturformat zur Verfügung gestellt werden, damit sie durch Zellinteraktionen kleine Knorpelaggregate bilden können. Des Weiteren darf das Nährmedium kein Serum mehr erhalten. Außerdem wird der Wachstumsfaktor TGF β in einer Konzentration von 10ng/ml [24], sowie Dexamethason in einer Konzentration von 10^{-7} M benötigt. Nach 7 Tagen Kulturdauer beginnt sich ein dreidimensionales Konstrukt zu formen, während sich nach 21 Tagen in der Matrix überall Kollagen Typ II nachweisen lässt. Ab Tag 14 lässt sich auch Kollagen Typ X nachweisen, das ein Hinweis für die Hypertrophierung des Knorpelgewebes ist [26].

1.3. Sexualhormone

1.3.1. Östrogen und Arthrose

Schon lange wird vermutet, dass Östrogen eine Rolle bei der Entstehung und Entwicklung der Arthrose spielt. Epidemiologische Daten zeigen einen deutlichen Anstieg der Arthroseprävalenz bei Frauen im Alter von 50 Jahren, also bei Beginn der Menopause. Vor diesem Alter tritt Gelenkverschleiß an Hüfte, Knie und Fingergelenken häufiger bei Männern auf [27].

Studien über die Wirksamkeit einer Hormonersatztherapie auf die Arthroseentwicklung bei postmenopausalen Frauen zeigen eine deutlich positive Wirkung von Östrogenen auf die Krankheitsentwicklung: Die Prävalenz von Krankheitssymptomen sowie das Fortschreiten von radiologischen Anzeichen für Arthrose wird bei Hüft- und Kniegelenksbefall unter der Behandlung vermindert. Trotz dieser Daten konnte bis jetzt kein direkter Zusammenhang zwischen Östrogenspiegel im Serum und Arthroserate gezeigt werden [28].

1.3.2. Synthese und Funktion von Sexualhormonen

1.3.2.1. Androgene

Androgene sind Steroidhormone, die für die Ausbildung männlicher Geschlechtsmerkmale verantwortlich sind. Sie werden in der Nebenniere und in den Leydigzellen des Hodens aus Cholesterin synthetisiert und wegen ihrer schlechten Löslichkeit im Blut mit Hilfe eines Testosteron- Östrogen bindenden Proteins transportiert. Die Synthese wird durch das thalamisch- hypothalamische System gesteuert und unterliegt einem Regelkreis mit negativer Rückkopplung durch Testosteron, Östrogen und das aus den Sertolizellen stammende Protein Inhibin. Neben seiner Wirkung auf die männlichen Fortpflanzungsorgane hat Testosteron einen ausgeprägten anabolen Effekt. Es führt zu einer gesteigerten Proteinsynthese in der Muskelzelle und somit zur Zunahme der Muskelmasse. Außerdem sorgt es bis zum Schluss der Epiphysenfugen nach der Pubertät für das Wachstum des Skelettsystems [29].

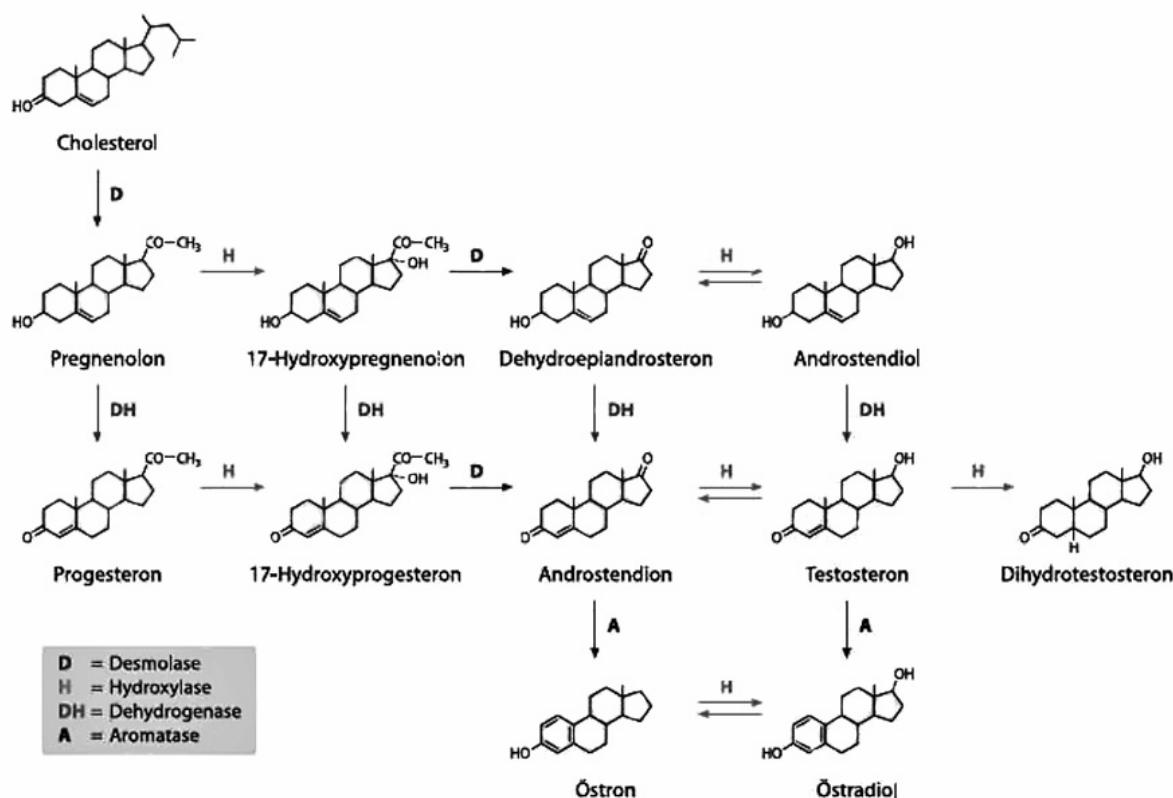


Abbildung 2: Synthese von Sexualhormonen [30]

1.3.2.2. Östrogen

Östrogene werden sowohl in den Thekazellen Graaf'scher Follikel und im Corpus luteum als auch in Hoden, Nebennierenrinde und Fettgewebe aus Cholesterin gebildet. Wie beim Mann unterstehen die weiblichen Geschlechtshormone dem thalamisch- hypothalamischen Regelkreis, jedoch unterliegt die darin vorhandene GnRH-Ausschüttung bei der Frau einem Rhythmus, der den Menstruationszyklus bedingt.

Östrogen sorgt für die Ausprägung weiblicher Geschlechtsmerkmale, induziert die Proliferationsphase der Uterusschleimhaut und bereitet zusammen mit Progesteron den Uterus für eine Schwangerschaft vor. Außerdem wird Östrogen eine leichte proteinanabole Wirkung zugeschrieben [29]. In Bezug auf das Knochenwachstum hat Östrogen konzentrationsabhängig verschiedene Rollen: Zu Beginn der Pubertät initiieren niedrige Plasmaspiegel den Wachstumsbeginn, während hohe Östrogenspiegel am Ende der Pubertät für den Schluss der Epiphysenfugen sorgen [31].

1.3.2.3. Steroidhormonrezeptoren

Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass Östrogen und Testosteron ausschließlich über die Modulation der somatotropen Achse und damit über das von der Hypophyse ausgeschüttete Wachstumshormon (GH) wirken. Mittlerweile weiß man, dass Sexualhormone in der Wachstumsfuge auch einen direkten Einfluss auf die Knochen- und Knorpelbildung ausüben [31]. Es werden ein Androgenrezeptor (AR) und zwei verschiedene Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) beschrieben, die ihre Funktion unterschiedlich vermitteln:

Der genomische Wirkmechanismus besteht darin, dass Steroidhormone im Zellkern an spezifische intrazelluläre Rezeptoren binden, die als Liganden- aktivierte Transkriptionsfaktoren die Transkription spezifischer Proteine regulieren [29].

Man geht davon aus, dass zumindest für Östrogen ein zweiter Wirkmechanismus existiert: Im nicht- genomischen Weg wird die Wirkung über cytoplasmatische, membranständige Rezeptoren und eine Signalkaskade mittels verschiedener Kinasen (SRC, Shc, Erk) ausgeführt. Es wird vermutet, dass der protektive Effekt von Östrogen in Bezug auf den Knochen- und Knorpelabbau vor der Menopause so vermittelt wird [31].

1.3.3. Hormonsensitivität von Chondrozyten

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass Sexualhormone direkt auf Chondrozyten wirken. In der Wachstumsfuge der Ratte beispielsweise lassen sich an Chondrozyten sowohl ER α und ER β , als auch AR nachweisen. Ein weiterer Hinweis auf die Hormonsensitivität von Chondrozyten wurde beschrieben: Schon länger ist bekannt, dass Gewebe, auf das Steroidhormone wirken, in der Lage ist, Sexualhormone aus dem Blut direkt in aktive Formen umzuwandeln und zu metabolisieren. Dieser Effekt vereinfacht das Zusammenspiel von Ligand und Rezeptor und wird Intrakrinologie genannt. Die dafür benötigten Enzyme, wie Aromatase, Hydroxysteroiddehydrogenase, Steroidsulfatase und 5 α -Reductase, lassen sich in der Wachstumsfuge nach-

weisen [31]. Im menschlichen Gelenkknorpel konnte der Nachweis für eine Expression der für ER α und ER β kodierende Gene erbracht werden [32].

1.4. Motivation dieser Arbeit

Das moderne Tissue engineering stellt eine erfolgsversprechende Alternative zur Therapie von fokalen Knorpeldefekten dar. Ungeklärt ist bis heute der Einfluss von Sexualhormonen auf die Proliferation und chondrogene Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen. Dieser Faktor ist von entscheidender Bedeutung, da sowohl die Entnahme der Spenderzellen, als auch die Re-Implantation des fertigen Tissue engineering Produkt in ein vom Patienten determiniertes Hormonmilieu erfolgen muss.

2. Fragestellung

Bei den durchgeföhrten Experimenten wurden während der Proliferationsphase der MSCs verschiedene Sexualhormone (Testosteron, 17 β -Estradiol und DHEA) zum Kulturmedium hinzugefügt. Die folgende Differenzierung zu Chondrozyten erfolgte im hormonfreien Standardmedium. Folgende Fragen sollten dabei untersucht werden:

Beeinflusst die Hormongabe die Expression von MSC- spezifischen immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen?

Exprimieren mesenchymalen Stammzellen und chondrogen differenzierte Zellen spezifische Rezeptoren für Östrogen und Testosteron?

Welchen Einfluss haben die einzelnen Sexualhormone auf die Proliferationsphase der MSCs und gibt es durch diese Vorbehandlung Auswirkungen auf die anschließende Chondrogenese?

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

1,9-Dimethyl-Methylenblau	Sigma Aldrich, Steinheim
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Roth, Karlsruhe
D-+Saccharose	Roth, Karlsruhe
DePex	Serva, Heidelberg
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dulbeccos PBS ohne K ⁺ +Mg ²⁺	PAA Laboratories, Pasching (A)
Ethanol absolut (100%),	J.T.Baker, Phillipsburg (USA)
Ethydiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylene diamine tetra acid	Sigma Aldrich, Steinheim
Ficoll-Lösung (ρ= 1,077 g/ml)	Biochrom, Berlin
Gelatine von porcine skin	Sigma Aldrich, Steinheim
HCL	Merck, Darmstadt
Hepes	Sigma Aldrich, Steinheim
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
Hormone:	
Testosteron purum	Fluka, Buchs (CH)
17β-Estradiol	Sigma Aldrich, Steinheim
trans- Dehydroandrosteron	Sigma Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nickelchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Pepsin from hog stomach	Fluka, Buchs (CH)
Phosphate buffered saline (PBS)	Fluka, Buchs (CH)

p-Xylol	Merck, Darmstadt
Resazurin sodium salt	Roth, Karlsruhe
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude (NL)
Tris base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypan blue solution 0,4%,	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin EDTA 1%	Gibco, Karlsruhe
Tyrodessalz	Sigma Aldrich, Steinheim
Wachstumsfaktoren:	
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Insulin transferrin sodium	Sigma Aldrich, Steinheim
Media supplement (ITS+3)	
Transforming growth factor β	R&D Systems, Wiesbaden
Wasserstoffperoxyd 30%	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedien und Medienzusätze:	
Dulbeccos Modified Eagle	Gibco, Karlsruhe
Medium (low / high glucose)	
Fetal bovine serum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Goat serum normal	Dako Cytomatic (DK)
Hepes buffer	Gibco, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Pyruvat	Gibco, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Combitips für Multipette 5ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville (USA)
Mikrotiterplatten 96-well	Falcon, Heidelberg
Nitrocellulosemembran	Osmonics, Minnetonka (USA)
Pipettenspitzen Dualfilter	Eppendorf, Hamburg
Polypropylen Tube 15ml, 50ml	Beckton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Polypropylenzentrifugenröhrchen	NeoLab, Heidelberg
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Stripetten Costar 10ml, 25ml, 50ml	Corning, Corning (USA)
Tissue-loc Cassettes	Richard Allan Scientific, Waltham (USA)
Zellkulturflaschen 75cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellulturschale 96well	TPP, Trasadingen (CH)
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.3. Geräte

Brutschrank CO ₂ Heracell 240	Heraeus, Hanau
Calimatic- pH- Meter 766	Knick, Berlin
Digitalfotokamera 5700	Nikon, Düsseldorf
FACS Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Leitz, Wetzlar
Homogenisator 40/E	XenoX, Niersbach
Kryostat HM 500 OM	Microm, Berlin
Microplate Reader	Tecan AG, Crailsheim
Microtom HM360	Microm, Berlin
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Mikroskop Fluovert FU	Leitz, Wetzlar
Mikroskopkamera DMC2	Polaroid, Offenbach
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Pipetboy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Polymax Taumler 2040	Heidolph, Schwabach
Präzisionswaage BP 221 S	Sartorius, Göttingen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler IKA Vibrax	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Waage EG 600-2M	Kern, Balingen-Frommern
Wärmeschrank Function Line UT12	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5415	Falcon, Heidelberg
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau

Tabelle 3: Verwendete Geräte

3.1.4. Puffer und Lösungen

ABC Lösung:	2,5ml	0,1M Trispuffer/ 1M PBS
	1 Tropfen	Reagenz A (= 40µl)
	1 Tropfen	Reagenz B (= 40µl)
Blockingpuffer:	120ml	0,2 M TRIS (0,08M)
	2400mg	NaCl (0,8%)
	60ml	4% Triton (0,8%)
	30ml	FCS (10%)
	30ml	Ziegenserum (10%)
	60ml	Aqua dest.
DAB Arbeitslösung:	9000µl	0,1M m-PBS
	1000µl	DAB/BSA
	400µl	Ni/Co Stammlösung
	6µl	H ₂ O ₂
DAB Stammlösung (10x):	0,5% Diaminobenzidin in 0,1% BSA	
DMMB Reagenzlösung (0,1%)	40mM	NaCl
	400mM	Glycin
	46µM	DMMB
	pH=3,0	
Ethidiumbromid Stammlösung	10mg/ml	Ethidiumbromid in H ₂ O
FACS- Puffer	PBS mit 1% FCS und 0,05% Na- Azid	
McIlvaine Puffer:	Lösung A:	0,1M Zitronensäure
	Lösung B:	0,2M Dinatriumhydrogen-
		phosphat
	für den richtigen pH x ml von Lösung A	
	+ (100 - x) ml von Lösung B	

m-PBS Puffer (1M):	47,2g	K ₂ HPO ₄
	6,6g	NaH ₂ PO ₄
	36,0g	NaCl
mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen		
pH= 7,0-7,4		
Ni/Co Lösung für DAB Arbeitslösung:	100mg	NiCl ₂
	5mg	CoCl ₂
	10mg	BSA
	10ml	H ₂ O
Paraformaldehydlösung (Standardfixans):	4g	Paraformaldehyd
	50ml	0,2M Phosphatpuffer
	50ml	Aqua dest.
PBS:	150mM	NaCl
	8mM	K ₂ HPO ₄
	2mM	NaH ₂ PO ₄
	pH=7,3	
Tris Puffer:	24,228g	TRIS base
	1000ml	Aqua dest.
	pH=7,0	
Tyrodes Lösung	9,73g	Tyrodes Salz
	0,2g	NaHCO ₃
	10ml	Penicillin-Streptomycin
	990ml	H ₂ O
Waschpuffer ohne Triton:	780 ml	0,2M TRIS-Puffer
	2220 ml	Aqua dest.
	24,96 g	NaCl

Essigsäurepuffer: 0,3g Essigsäure (0,05M)
100ml Aqua dest.
2,922g NaCl (0,5M)
pH= 2,9-3,0

TBS-Puffer (10x): 12,114g TRIS (1,0M)
11,69g NaCl (2,0M)
555mg CaCl₂ (50mM)
100ml Aqua dest.
pH=7,8-8,0

Pepsinlösung : 10mg/ml gelöst in 0,05M Essigsäure

Pankreaselastase: 1mg/ml in 1x TBS

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

3.2. Methodik

3.2.1. Überblick über Versuchsaufbau und Patientenkollektiv

Humane native mesenchymale Stammzellen wurden unter dem Einfluss verschiedener Sexualhormone (Testosteron, 17 β -Estradiol, DHEA) kultiviert (Proliferationsphase) und daraufhin ohne Hormoneinfluss zu Knorpelaggregaten differenziert (Differenzierungsphase). Die Wirkung der Steroidhormone sowohl auf das Zellwachstum in der Proliferationsphase, als auch auf die Chondrogeneseleistung wurde untersucht.

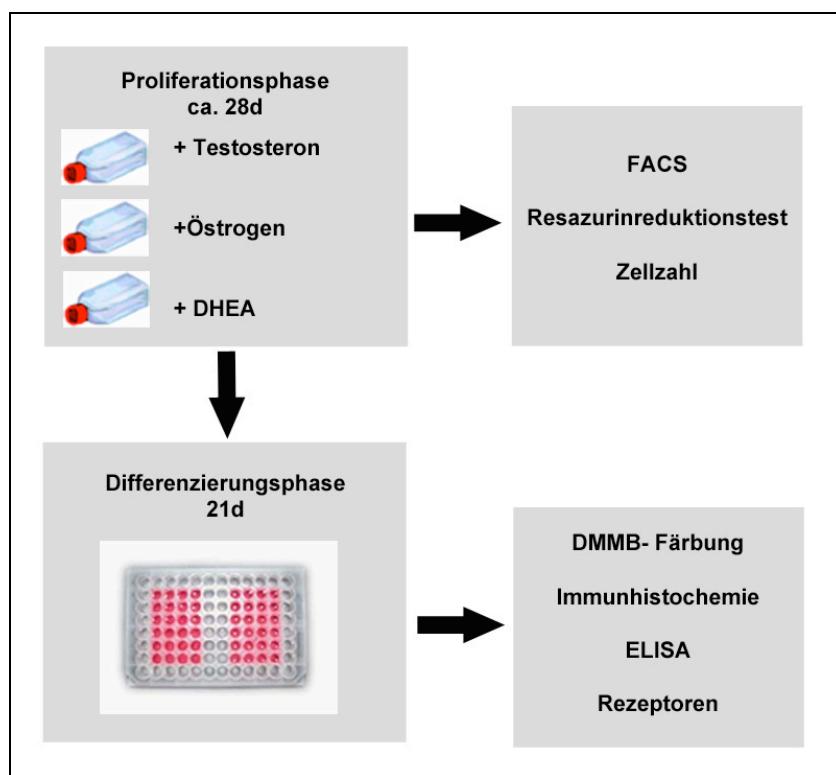


Abbildung 3: Versuchsaufbau

Für das Gewinnen von mesenchymalen Stammzellen standen unfallchirurgische Patienten der Uniklinik Regensburg als freiwillige Spender bereit. Es handelte sich dabei um Patienten, bei denen während einer Operation ein Knochenkeil aus dem Beckenkamm zur Defektdeckung an einer anderen Stelle, meist zur Stabilisierung von Wirbelsäulenverletzungen, entnommen wurde. Die Knochenmarkpunktion am Beckenkamm stellte demnach keinen zusätzlich traumatischen Eingriff dar. Die Patienten wurden vor der Operation über die Weiterverwendung ihrer Zellen zu Forschungszwecken aufgeklärt und eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Bei den

Spender handelte es sich ausschließlich um männliche Patienten im Alter zwischen 19 und 45 Jahren.

3.2.2. Proliferation von mesenchymalen Stammzellen

3.2.2.1. Zellentnahme im OP

Nach dem Hautschnitt wurden mit Hilfe einer 14G Jamshidi- Nadel 20ml Knochenmark aus dem Beckenkamm aspiriert. Zu der gewonnenen Zelllösung wurden 100IE Heparin gegeben, die Spritzen bei 4°C gelagert und baldmöglichst im Labor aufbereitet.

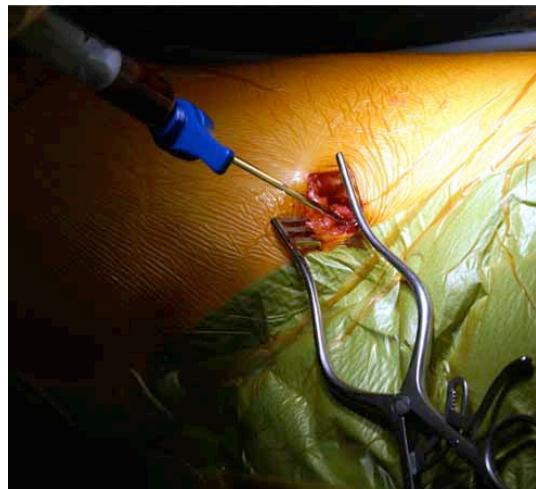
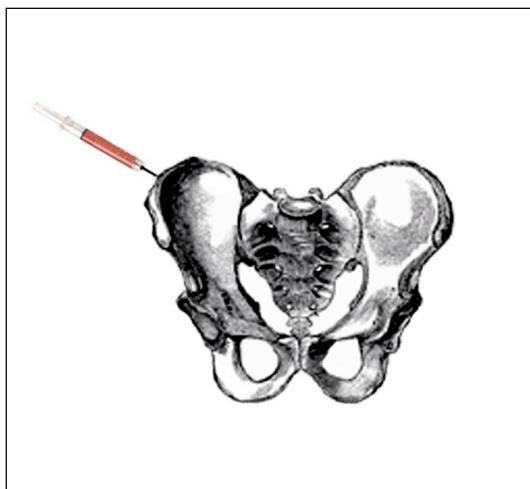


Abbildung 4: Knochenmarkentnahme

links: Punktionsort schematisch

rechts: Punktionsort im Operationssaal

3.2.2.2. Gewinnung mononukleärer Zellen

Unter Verwendung eines Ficoll- Dichtegradienten wurden die Knochenmarkszellen nach ihrer Dichte in spezifische Schichten aufgeteilt und die mononukleären Zellen daraus isoliert. Dazu wurde die heparinisierte Knochenmarkssuspension 1:10 mit

DMEM MSC-Medium verdünnt und im Verhältnis 1:2 vorsichtig auf die Ficoll- Lösung geschichtet. Daraufhin wurde 30min bei 216g ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellen aus der Interphase wurden vorsichtig herauspipettiert. Die gewonnene Zellmischung bestand außer aus Erythrozyten und Thrombozyten aus verschiedenen Zellen des Knochenmarks und damit nur zu einem geringen Anteil aus MSCs. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen bei -80°C in Zellkulturmedium bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.2.2.3. Proliferation in Monolayerkultur

Von jedem Patienten wurden in Zellkulturflaschen jeweils 2 Millionen Knochenmarkzellen ausgesät und in vier Gruppen je nach ihrer Behandlung mit Testosteron, 17β -Estradiol, DHEA oder als Negativkontrolle ohne zusätzliches Hormon aufgeteilt. Zunächst wurden die eingefrorenen Zellen durch Schwenken in einem Wasserbad bei 37°C langsam aufgetaut, in 10ml MSC- Medium aufgenommen und mit Trypanblau ausgezählt. So konnte sichergestellt werden, dass genügend lebendige Zellen verwendet wurden. Auf eine Zentrifugation wurde zum Schutz der Zellen verzichtet. Jede Flasche erhielt 15ml Medium in dem 2 Millionen Knochenmarkszellen sowie eine Konzentration von 10^{-7}M des jeweiligen Hormons enthalten waren.

Die Flaschen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach 7-8 Tagen wurde kontrolliert, ob die Zellen adharent waren, und dann zum ersten Mal das Medium gewechselt. Daraufhin fand der Mediumwechsel regelmäßig alle 4 Tage statt. Dazu wurde das alte Medium mit Pasteurpipetten aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und jeweils 15ml des frischen Medium- Hormongemisches dazugegeben.

500ml DMEM low glucose

+ 0,5g Glukose	+ 10% fetales Kälberserum
+ 0,5g L-Glutamine	+ 1% Penicillin-Streptomycin
+ 0,5g Pyruvat	+ 1% Hepes

Tabelle 5: Proliferationsmedium MSCs

Um eine hormonelle Verunreinigung des verwendeten fetalen Kälberserums auszuschließen wurden die darin enthaltenen Konzentrationen von Testosteron, Östrogen und DHEA mit Hilfe der Verfahren des Instituts für klinische Chemie bestimmt.

	MSC- Medium mit FCS	Normwerte menschliches Serum
Testosteron	10^{-15} M	1,04-2,77 $\times 10^{-8}$ M
Östrogen	unter Nachweisgrenze ($< 4 \times 10^{-5}$ M)	0,6-1,5 $\times 10^{-8}$ M
DHEA	unter Nachweisgrenze ($< 5 \times 10^{-13}$ M)	0,35-1,04 $\times 10^{-5}$ M

Tabelle 6: Vergleich der Hormonwerte im verwendeten MSC- Medium ohne zusätzliches Hormon mit den Normwerten im menschlichen Serum (verwendete Werte gelten für erwachsene Männer) [33]

3.2.2.4. Zellauszählung

Nach 4-5 Wochen Kulturdauer war der Flaschenboden zu 80% mit Stammzellen bedeckt und die Zellen konnten abgelöst und ausgezählt werden. Zu diesem Zeitpunkt standen für die Differenzierungsphase genügend Zellen zur Verfügung und die am Boden adhärierenden Zellen behinderten sich nicht gegenseitig im Wachstum.

Aus den Zellkulturflaschen wurde das Medium abgesaugt, mit 5ml PBS gespült und 3ml im Wasserbad aufgewärmtes Trypsin dazugegeben. Nach 5min war der Zellrasen vom Flaschenboden abgelöst, so dass die enzymatische Reaktion durch die Zugeabe von 10ml Medium abgestoppt werden konnte. Der Inhalt der Flaschen einer Versuchsgruppe wurde in einem 50ml Falcon gepoolt und die Zellsuspension 10min mit 216g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 5ml Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen in einer Neubauer- Zählkammer mit Hilfe einer Lebend- Totfärbung mit Trypanblau ausgezählt.

3.2.3. Fluoreszenzmessungen

3.2.3.1. Resazurinreduktionstest

Um das Zellwachstum verfolgen zu können, wurde die intrazelluläre Reduktion des farblosen Stoffs Resazurin zum stark fluoreszierenden Resorufin durch Fluoreszenzmessung mit Hilfe eines Microplate Readers gemessen. Dabei korreliert der gemessene Farbumschlag mit Anzahl und Stoffwechselaktivität der Zellen.

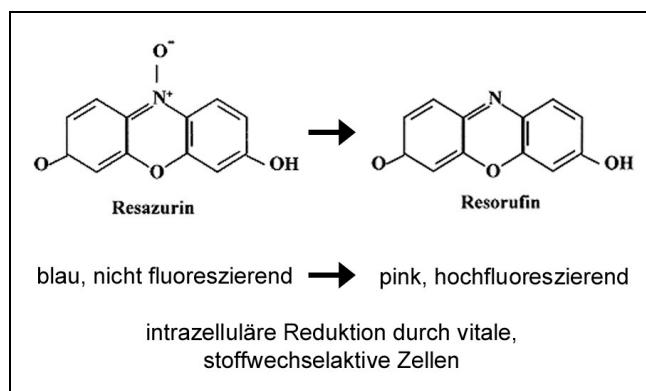


Abbildung 5: Resazurinreduktionstest

Zunächst wurde ein Vorversuch durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen Fluoreszenz und Zellzahl in Abhängigkeit von verschiedenen Resazurinkonzentrationen darzustellen. Dazu wurde immer eine definierte Zellzahl (512, 1280, 3200, 8000, 20000 und 50000 Zellen) pro ml Zellkulturmedium mit Resazurinkonzentrationen von 0,66mM, 0,5mM, 0,37mM, 0,28mM und 0,21mM eine Stunde lang inkubiert. Daraufhin wurde die Fluoreszenz des Überstandes bei 485nm gemessen.

Im Hauptversuch wurde das Zellwachstum mit Hilfe des Resazurinreduktionstests beobachtet. Dazu wurde jeweils eine der 6 Zellkulturflaschen pro Hormon gekennzeichnet und bei jeder Messung wieder verwendet. Gemessen wurde alle 8 Tage. Als Farbstoff diente in Anlehnung an die Methodik von O'Brian [34] eine 0,44mM Resazurinlösung in PBS, die bis zur Benutzung bei -20°C eingefroren war und vor der Verwendung unter Berücksichtigung der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffs im Wasserbad aufgetaut wurde.

Aus jeder der 4 Flaschen wurde das Medium abgesaugt, 10ml Medium mit 1ml Resazurin auf den Zellrasen gegeben, vorsichtig gemischt und die Flaschen 1h im Brutschrank inkubiert. Zusätzlich wurde eine Flasche nur mit 10ml Medium und 1ml Resazurin inkubiert, die bei der Messung als Leerwert diente. Danach wurde der Überstand abgenommen und jeweils in einen 15ml Falcon gegeben. Die Zellkultur wurde einmal mit Medium gespült und erhielt wieder frisches Hormon-Medium Gemisch.

Jeweils 100 μ l des Überstands der mit den verschiedenen Hormonen (Testosteron, 17 β -Estradiol, DHEA, Kontrolle, Leerwert) behandelten Zellen wurden in fünf Replikationen auf 96- well- Platten pipettiert und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 485nm gemessen.

3.2.3.2. Lebend- Tot- Färbung

Um zu überprüfen, ob das in den Fluoreszenzmessungen verwendete Resazurin den Zellen schadete, wurde deren Vitalität mittels eines Live/Dead- Viability/Cytotoxicity-Assays der Firma Invitrogen untersucht. Die Substanzen Calcein AM und Ethidium homodimer- 1 geben Aufschluss über die intrazelluläre Esterase- Aktivität und die Membranintegrität der Zelle und detektieren so die Zellaktivität. Calcein wird durch eine Esterase intrazellulär zu einem grün fluoreszierenden Substrat hydrolysiert. Das rot fluoreszierende Ethidium homodimer-1 passiert beschädigte Membranen toter Zellen und lagert sich an Nukleinsäuren an. Lebende Zellen fluoreszieren bei dieser Doppelfärbung folglich grün, tote Zellen rot.

Für die Färbung wurden pro well 2000 MSCs in 96- well- Platten 3 Tage lang in MSC- Zellkulturmedium kultiviert, um deren Anhaften am Boden zu garantieren. Daraufhin wurde Resazurin in Konzentrationen von 0,1- 1,0mM für 12h dazugegeben. Zur Negativkontrolle wurden ein Teil der Zellen mit 100%igem Ethanol abgetötet. Vor der Messung mit dem Fluoreszenzmessgerät wurde das Resazurin abgesaugt und durch PBS ersetzt. Calcein wurde in einer Konzentration von 1 μ M für 30min inkubiert und die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 515nm gemessen.

3.2.3.3. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Um zu untersuchen, ob die Steroidhormone die MSCs in ihren Oberflächenstrukturen verändern oder sogar deren Differenzierung zu speziellen Zellen wie z.B. Fibroblasten bewirken, wurden die Oberflächenantigene der Zellen eines Patienten zum Zeitpunkt des Endes der Proliferationsphase mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die Zellen wurden zunächst zentrifugiert und das Zellkulturmedium mit FACS- Puffer ausgewaschen. Je 10^6 Zellen wurden auf ein FACS- Röhrchen verteilt. Daraufhin wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen verschiedenen CD- Proteine an der Zelloberfläche gerichtet waren, inkubiert. Die Inkubationszeit für Antikörper und Isotypkontrollen betrug 30min bei 4°C (Ausnahme: Antikörper für CD34 10min) in einem Reaktionsvolumen von 300µl. Alle Antikörper waren mit FITC - fluoreszierendem Fluoresceinisothiocyanat gelabeled. Durch unterschiedliche Fluoreszenz konnten die Zellen in verschiedene Fraktionen – in diesem Fall in CDpos oder CDneg aufgeteilt werden. Autofluoreszenz der Zellen sowie tote Zellen wurden herausgefiltert. Es wurden folgende Oberflächenstrukturen untersucht: CD14, CD29, CD34, CD44, CD105, CD166.

	Verdünnung	Firma
Antikörper		
anti- CD14 IgG-FITC	unverdünnt	Ebioscience, San Diego (USA)
anti- CD29 IgG-FITC	unverdünnt	Acris, Hiddenhausen
anti- CD34 IgG-FITC	1:10	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti- CD44 IgG-FITC	unverdünnt	Acris, Hiddenhausen
anti- CD105 IgG-FITC	unverdünnt	Acris, Hiddenhausen
anti- CD166 IgG-FITC	unverdünnt	Acris, Hiddenhausen
Isotypkontrollen		
mouse IgG1-FITC	unverdünnt	Acris, Hiddenhausen
mouse IgG2a-FITS	unverdünnt	Acris, Hiddenhausen

Tabelle 7: Verwendete Antikörper für die FACS- Analyse

3.2.4. Differenzierung zu Chondrozyten

3.2.4.1. Differenzierung in der 3D-Kultur

Die Zellen wurden nach der Zellauszählung zunächst noch einmal 10min mit 216g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Differenzierungsmedium angesetzt, die Zellen resuspendiert und mit einer Multipette auf die 96well-Platte verteilt. Jedes well erhielt 200.000 Zellen. Die Platten wurden daraufhin 5min zentrifugiert und in den Brutschrank gestellt. Vor jedem Mediumwechsel wurde das Medium frisch angesetzt und 3x pro Woche gewechselt, wobei jeweils 350µl davon mittels einer Multipette in das vorher abgesaugte well gegeben wurden. Nach 21 Tagen Kulturdauer konnten die gebildeten Knorpelaggregate entnommen werden.

500ml D-MEM High Glucose 4,5g/l:

- + 1% Sodium - Pyruvat
- + 1% Dexamethason
- + 1% ITS 3
- + 1% Ascorbinsäure
- + 0,5% TGF β

Tabelle 8: Differenzierungsmedium

Ascorbinsäure (20mM):	0,1024g 20ml steril filtriert	Ascorbinsäure Tyrodes-Lösung
Dexamethason Stocklösung (1mM):	0,00392g 10ml	Dexamethason 100% Ethanol
Dexamethason Gebrauchslösung (10µM):	200µl 19,8ml steril filtriert	Stocklösung DMEM Low Glucose

TGF-recombinant:	12,5mg 0,5 ml 12ml ein Fläschchen TGF Lyophilisat in 10ml Puffer gelöst Endkonzentration: 10ng/ml	BSA 0,1M HCL H ₂ O
------------------	--	-------------------------------------

Tabelle 9: Wachstumsfaktoren für die Chondrogenese

3.2.4.2. Fixierung zur histologischen Auswertung

Die entnommenen Aggregate wurden zunächst mit Standardfixans ohne Glutaraldehyd eine Stunde lang fixiert. Nach Auswaschen mit 0,1M Phosphatpuffer wurden die Aggregate in eine aufsteigende Glukoselösung (10%-1h, 20%-1d, 30%-3d) eingebettet. Aggregate, die mit dem Gefriermikrotom geschnitten werden sollten, wurden in Tissue Tek eingebettet und bei -80°C eingefroren. Für den ELISA und die DNA-Bestimmung wurden die Aggregate direkt bei -80°C in Eppendorfcups eingefroren. Aggregate, bei denen für die Anfärbung von Rezeptoren eine Paraffineinbettung nötig war, wurden nicht mit Saccharoselösung behandelt, sondern direkt in Paraffin eingebettet.

3.2.4.3. Anfertigung von histologischen Schnitten

Für die histologische Untersuchung der Aggregate wurden mit dem Gefriermikrotom Schnitte einer Dicke von 12µm angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgenommen.

Um Steroidhormonrezeptoren anfärben zu können, wurden in Paraffin eingebettete Aggregate mittels eines Paraffinschneidegeräts 4µm dick geschnitten. Es wurden unbeschichtete Objektträger verwendet.

3.2.4.4. DMMB-Färbung (Methylenblau)

Methylenblau bildet Komplexe mit den in der extrazellulären Matrix enthaltenen Glykosaminoglykanen, wodurch diese violett angefärbt werden können. Die Objekträger mit den Präparaten wurden in einer Glasküvette 5min in Aqua dest. rehydriert, um dann 5min in DMMB Reagenzlösung abgefärbt zu werden. Der überschüssige Farbstoff wurde in Aqua dest. kurz gewaschen, die Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (90%, 96%, 100%, Xylol) entwässert und mit Deckplättchen versehen.

3.2.4.5. Immunhistochemische Färbungen

Bei den Präparaten sollte das Vorkommen und die Verteilung von Kollagen Typ II sowie das Vorhandensein von Steroidhormonrezeptoren, wie dem Androgenrezeptor (AR) und Östrogenrezeptoren (ER α und ER β), untersucht werden. Bei immunhistochemischen Färbungen werden zwei verschiedene Antikörper verwendet. Der Primärantikörper ist gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet und stammt meist von Kaninchen oder Mäusen. Ein Sekundärantikörper von einem weiteren Tier (z.B. Ziege) ist gegen das Fc- Fragment des Primärantikörpers gerichtet und bei der hier verwendeten Streptavidin- Biotin- Methode mit Biotin markiert. Biotin zeigt eine hohe Affinität zu Streptavidin, mit dem es Komplexe bildet. Dieses Verhalten macht man sich dadurch zunutze, dass man an Streptavidin ein Enzym (in diesem Fall Meerrettichperoxidase) koppelt, das geeignet ist, ein farbloses Chromogen zu einem Farbstoff umzuwandeln. Durch die Komplexbildung wird die Farbreaktion verstärkt und das Antigen lässt sich im Lichtmikroskop betrachten.

Die Schnitte wurden zunächst 10min in Waschpuffer in einer Glasküvette rehydriert und in eine feuchte Färbekammer eingespannt. Um die Dichtigkeit der Färbekammer zu überprüfen, wurden die einzelnen Schnitte mit je 200 μ l Waschpuffer aufgefüllt. Eine auf 0,1% in McIlvaine- Puffer verdünnte Pepsinandaulösung wurde für 15min dazu gegeben, um die Reaktivität der durch die Formalinfixierung maskierten Gewebeiteile wieder herzustellen. Nachdem dreimal mit Waschpuffer gespült worden war, wurde mit Blockingpuffer für 60min geblockt, um unspezifische Bindungen des Pri-

märantikörpers zu verhindern. Der unkonjugierte Primärantikörper wurde mit Blockingpuffer 1:100 verdünnt und 24h auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde mit Waschpuffer gewaschen und der biotinmarkierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 mit Blockingpuffer für 60min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die unspezifischen Peroxidasen mit 8ml PBS + 1ml Methanol + 1ml 30% H₂O₂ für 30min geblockt. Währenddessen wurde die ABC-Lösung aus einem vorgefertigten Set aus Streptavidin und biotinisiertem Enzym hergestellt und vor Gebrauch 30min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert. Der gebrauchsfertige AB- Komplex wurde nach einem Waschschritt für 90min auf den Schnitten belassen. Nachdem mit Waschpuffer gewaschen worden war, wurden die Schnitte aus den Haltern genommen und in einer mit Waschpuffer gefüllten Glasküvette gesammelt.

Kollagen Typ II:			
Primärantikörper:			
Mouse anti- human IgG	1:100	Calbiochem, S. Diego (USA)	
Sekundärantikörper:			
Biotin-SP-conjugated goat-anti-mouse IgG	1:100	Dianova, Hamburg	
Steroidhormonrezeptoren:			
Primärantikörper:			
Mouse anti- human ER α IgG	1:100	ABR, Corby (UK)	
Rabbit anti- human ER β IgG	1:100	Upstate, Billerica (USA)	
Mouse anti- human AR IgG	1:50	Dianova, Hamburg	
Sekundärantikörper:			
Biotin-SP-conjugated goat anti- rabbit IgG	1:100	Dako, Hamburg	
Biotin-SP-conjugated goat anti- mouse IgG	1:100	Dako, Hamburg	

Tabelle 10: Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Zur Entwicklung der Schnitte dienten an das Streptavidin gebundene Meerrettichperoxidasen und das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin. Kleine Tropfen der kurz zuvor hergestellten DAB-Lösung wurden auf die Schnitte geträufelt, auf denen sich nach einigen Minuten in Bereichen, in denen Kollagen Typ II vorkam, eine braune Farbre-

aktion zeigte. Die DAB-Lösung wurde entfernt, die Schnitte in Waschpuffer gesammelt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Deckblättern versehen.

Die für die Anfärbung der Steroidhormonrezeptoren verwendeten Paraffinschnitte mussten zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden sie zunächst bei 60°C 15min lang in einen Wärmeschrank und daraufhin 3x jeweils 10min in Xylol gelegt. In einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 80%, 70% Ethanol bis H₂O) wurden die Schnitte rehydriert und 20min lang in 0,01M Citratpuffer auf ca. 90°C in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Präparate auf Raumtemperatur abgekühlt worden waren, wurden sie in Waschpuffer gesammelt und die unspezifischen Peroxidasen mit 8ml PBS + 1ml Methanol + 1ml 30% H₂O₂ für 30min geblockt. Die Schnitte wurden in eine feuchte Färbekammer eingespannt, jeweils 100µl gebrauchsfertiges Zellkulturtrepsin zur Demaskierung von Bindungsstellen hinzugefügt und 20min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt wurde mit 10% FCS, 1% BSA und 10% Ziegenserum in 0,05M TBS 45min lang geblockt.

Daraufhin wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 (ERα und ERβ) bzw. 1:50 (AR) in 1% BSA auf einer Wippe 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden mit Waschpuffer abgespült und der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 mit 1% BSA in TBS 1h lang inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die weitere Behandlung der Schnitte mit ABC- Lösung und deren Entwicklung mit dem Chromogen 3,3-Diaminobenzidin analog zur Kollagen Typ II Färbung.

3.2.4.6. Kollagen Typ II - Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum quantitativen Nachweis von Kollagen Typ II in den Aggregaten wurde ein ELISA mittels des Native Type II Collagen Detection Kit der Firma Chondrex durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Sandwich- ELISA: Das Antigen befindet sich in der Mitte zwischen zwei verschiedenen Antikörpern, wovon der erste (Capture Antikörper) immer an eine feste Phase, in diesem Fall die 96-well-Platte, bindet. Dadurch wird der Antikörper- Antigen- Antikörper-Komplex immobil, was die Trennung von gebundenen und ungebundenen Bestandteilen vereinfacht. Der Nachweis von Kolla-

gen Typ II geschieht durch eine Farbreaktion, bei der ein an den zweiten Antikörper (Detection Antikörper) bindendes Enzym ein farbloses Chromogen in einen Farbstoff umwandelt, dessen Konzentration photometrisch gemessen wird und mit der Kollagenkonzentration korreliert.

Um Kollagen Typ II nachweisen zu können, müssen zunächst die in den Aggregaten vorhandenen Kollagenpolymere zu Monomeren verdaut werden. Dabei wurden immer vier Knorpelaggregate zu einer Probe verarbeitet. Die Aggregate wurden mit 200 μ l Essigsäure in NaCl (pH 2,9-3) in einem Homogenisierer zerkleinert. Daraufhin wurden pro Probe noch einmal 200 μ l Essigsäure in NaCl (pH 2,9-3) sowie 50 μ l Pepsinlösung dazugegeben, um N- und C- terminale Enden der Peptidketten und damit die Fibrillenstruktur des Kollagen aufzulösen. Die Proben wurden 48h lang auf einem Rotator im Kühlschrank bei 4°C inkubiert, 50 μ l 10xTBS dazupipettiert und der pH-Wert auf 8 eingestellt. Dieser pH Wert stellt das Optimum für die Pankreaselastase dar, von der 50 μ l in einer Konzentration von 1 mg/ml in TBS zur Probe gegeben wurden. Die Proben wurden 24h auf dem Rotator im Kühlschrank inkubiert, für 5min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei –20°C eingefroren, sofern er nicht am selben Tag für den ELISA benutzt wurde.

Für den ELISA selbst wurden nur Reagenzien aus dem Kit des Herstellers verwendet. Zunächst wurde 1l 1M Waschpuffer hergestellt. In eine sterile 96well- Platte wurden pro well je 100 μ l Capture Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 mit Lösungspuffer über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben folgendermaßen mit Verdünnungspuffer verdünnt: Aggregate von Tag 21 generell im Verhältnis 1:60 und 1:100, besonders kleine Aggregate von Tag 21 im Verhältnis 1:15 und 1:60, Tag 0 wurde nicht verdünnt. Der Standard wurde zu Konzentrationen von 0,2 μ g/ml bis 0,003 μ g/ml verdünnt. Überschüssige Capture Antikörper wurden mit Waschpuffer abgespült, wobei darauf geachtet wurde, dass die Platte nicht austrocknete. Pro well wurden je 100 μ l von Proben, Standard und Leerwert (nur Puffer) aufgetragen und 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde der Detection Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in Lösungspuffer mit je 100 μ l pro well aufgetragen und für 2h inkubiert. Die Platte wurde erneut gewaschen, bevor Streptavidin- Peroxidase in einer Verdünnung von 1:100 dazupipettiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1h folgte wieder ein Wasch-

gang. Daraufhin wurde das Chromogen dazugegeben: Eine Tablette Urea H_2O_2 wurde in der Verpackung zerdrückt, mit einer OPD Tablette in 20ml Aqua dest. gelöst und von der entstandenen unstabilen Lösung sofort 100 μ l in jedes well pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 30min unter Lichtschutz wurde die Reaktion mit 50 μ l Schwefelsäure pro well abgestoppt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen.

3.2.4.7. DNA- Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des DNA- Gehalts der Proben wurde nach dem Protokoll des Pico- Green Doppelstrang- DNA Assays der Firma Invitrogen vorgegangen. Pico- Green ist ein fluoreszierender Interkalator, der sich an die Doppelstrang- DNA der Proben anordnet und mit einem Fluoreszenzmessgerät quantitativ erfasst werden kann. Es wurden die für den ELISA schon vorverdauten Proben verwendet.

Zunächst wurde die Probe 1:30 mit 1M TE- Puffer verdünnt und eine Standardreihe im Bereich von 1 μ g/ml bis 0,03125 μ g/ml erstellt. Je 100 μ l Probe bzw. Standard wurden auf eine 96-well-Platte gegeben und 100 μ l des Fluoreszenzfarbstoffs in einer Verdünnung von 1:200 dazupipettiert. Es wurde maximal 5min lang lichtgeschützt inkubiert und die Fluoreszenzmessung bei einer Wellenlänge von 480nm zur Anregung und 520nm zur Emission durchgeführt.

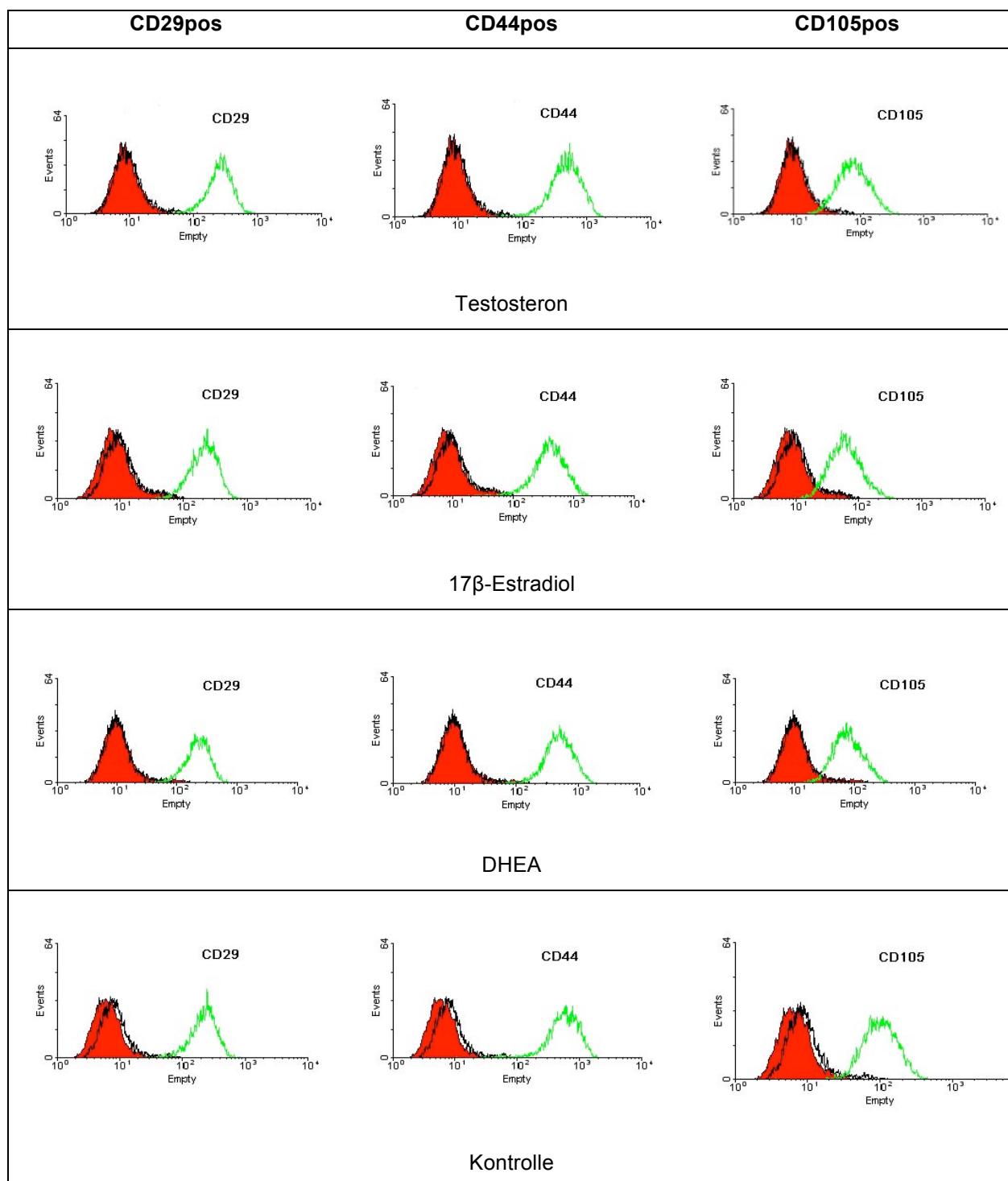
3.2.5. Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurde als nicht- parametrischer Test der H-Test nach Kruskal und Wallis verwendet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaStat der Firma Systat Software GmbH, San José (USA), durchgeführt. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als signifikant akzeptiert.

4. Ergebnisse

4.1. Proliferationsphase

4.1.1. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)



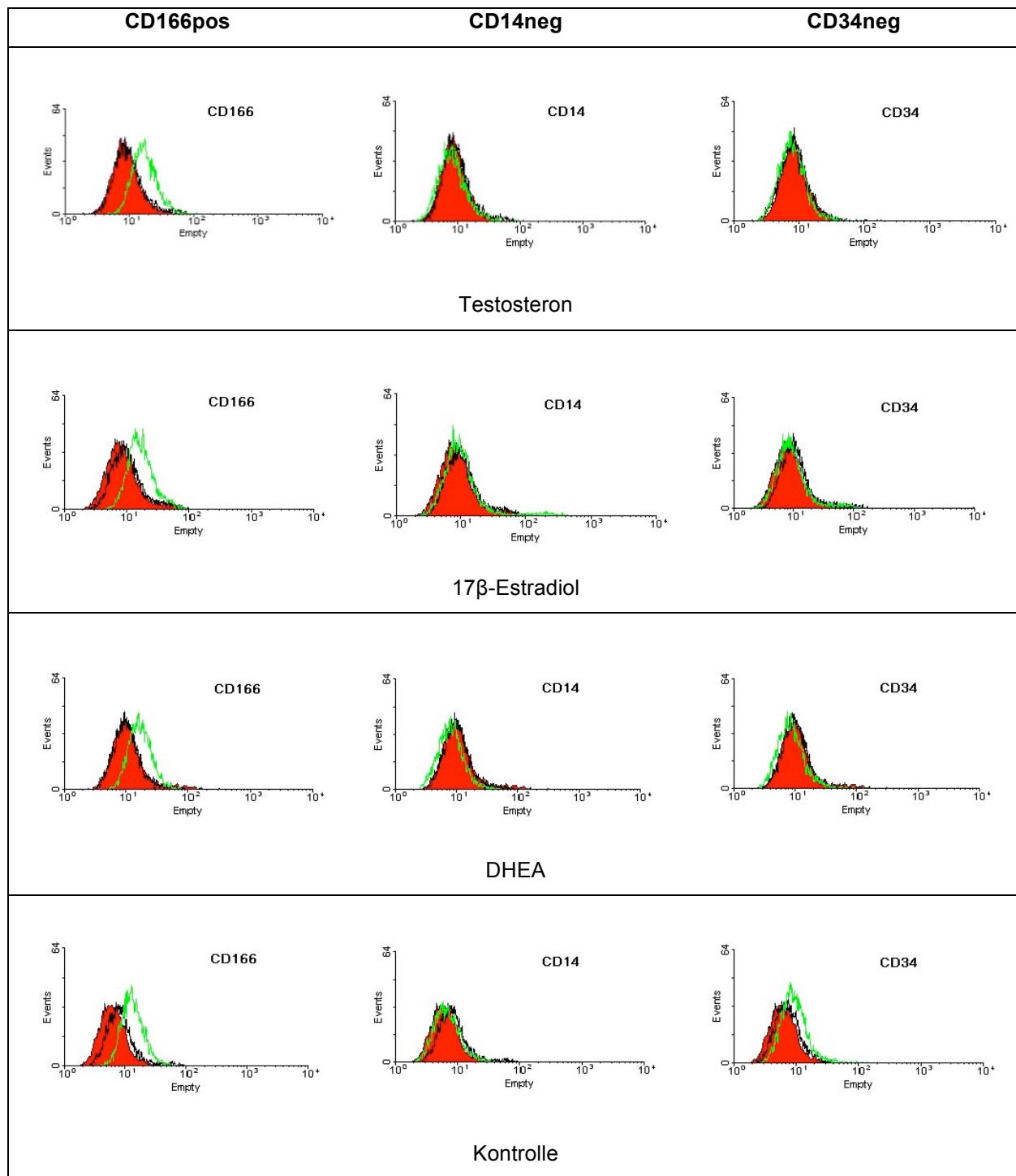


Abbildung 6: FACS- Analyse für CD29, CD44, CD105, CD166, CD14, CD34

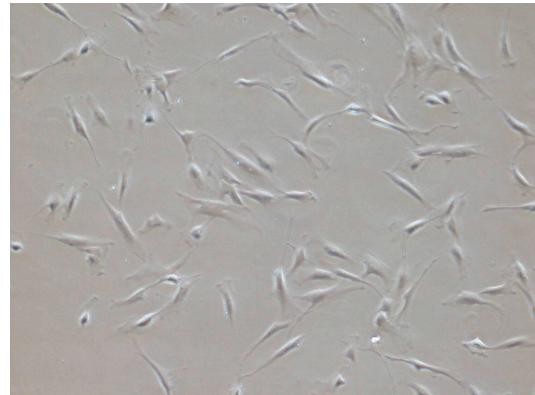
Die schwarze Kurve zeigt die Isotypkontrolle, die rote Fläche die Autofluoreszenz, die grüne Kurve die spezifische Fluoreszenz des jeweils markierten CD- Proteins.

Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen aller vier Hormongruppen waren nach 27 Tagen Kulturdauer unter Hormoneinfluss positiv für CD29, CD105, CD44 und CD166, sowie negativ für CD14 und CD34.

Im mikroskopischen Eindruck ähnelten die Zellen Fibrozyten. Es bestand kein Unterschied zwischen den einzelnen Hormongruppen bei verblindeter Kontrolle durch zwei Untersucher.



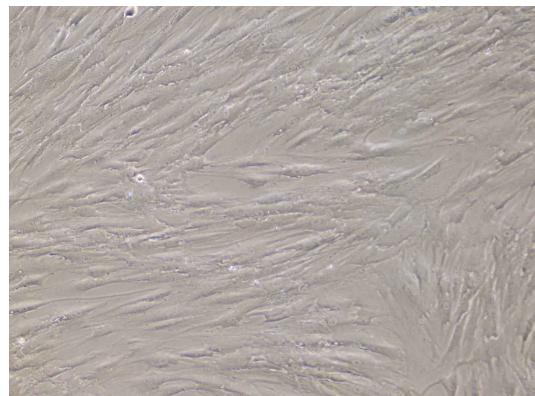
d18, 4x



d18, 10x



d24, 4x



d24, 10x

Abbildung 7: MSCs an Tag 18 und Tag 24 der Proliferationsphase,
jeweils 4x und 10x vergrößert

4.1.2. Resazurinreduktionstest

Mit Hilfe des verwendeten Life-Dead-Kits konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Stammzellen mit Konzentrationen von 0,1-1mM Resazurin die Vitalität der Zellen nicht beeinflusst. Zellen, die mit Alkohol abgetötet worden waren und somit auch das Resazurin nicht mehr verstoffwechseln konnten, zeigten Fluoreszenzwerte von ca. 900 RFU. Im Gegensatz dazu wiesen sämtliche lebendige Zellen Werte von über 3000 RFU auf.

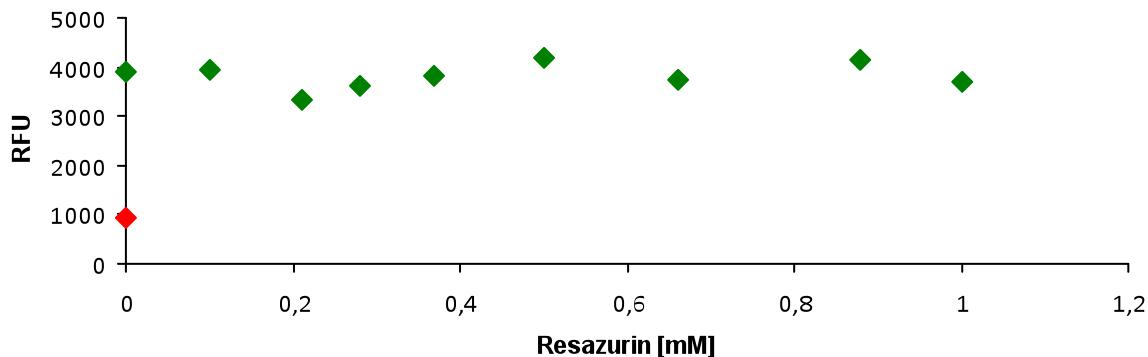


Abbildung 8: Unterschiedliche Fluoreszenzwerte gemessen in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) von lebendigen Zellen (grün) und toten Zellen (rot) in Abhängigkeit zur verwendeten Resazurinkonzentration

Mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung konnte die Vitalität der Zellen nach Inkubation mit Resazurin mit maximaler Konzentration von 1,0 mM dargestellt werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die im Hauptexperiment verwendete Resazurinlösung (0,44mM) die Vitalität der Zellen nicht bedroht.

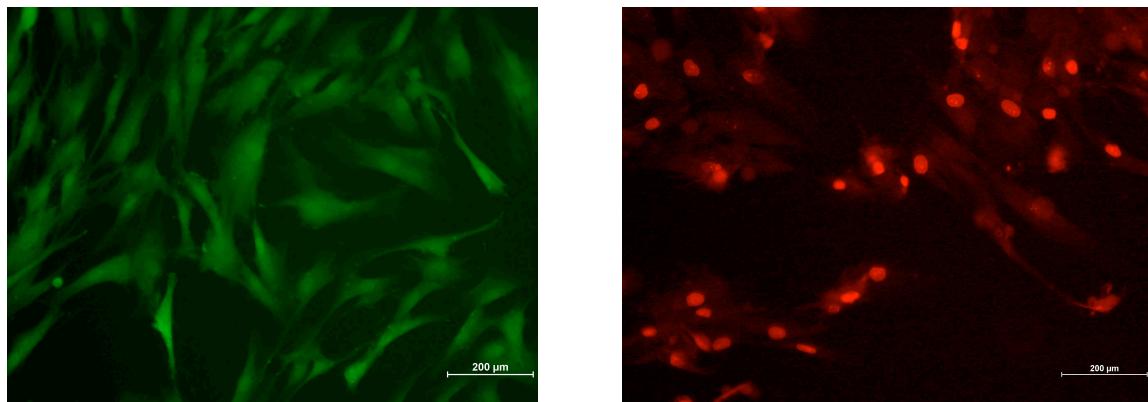


Abbildung 9: Linker Bildteil:

Lebende Zellen nach Resazurinbehandlung (1mM, Inkubationszeit von 12 Stunden) grün gefärbt mit Calcineurin

Rechter Bildteil:

Tote Zellen (100% Ethanol, Inkubationszeit 12 Stunden) rot gefärbt mit Ethidiumbromid

In einem weiteren Vorversuch wurde die relative Fluoreszenz von Zellzahlen von 512-50.000 pro well bei verschiedenen Resazurinkonzentrationen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Zellzahl mit der Fluoreszenz bei Konzentrationen von 0,21-0,66mM Resazurinlösung suffizient miteinander korreliert.

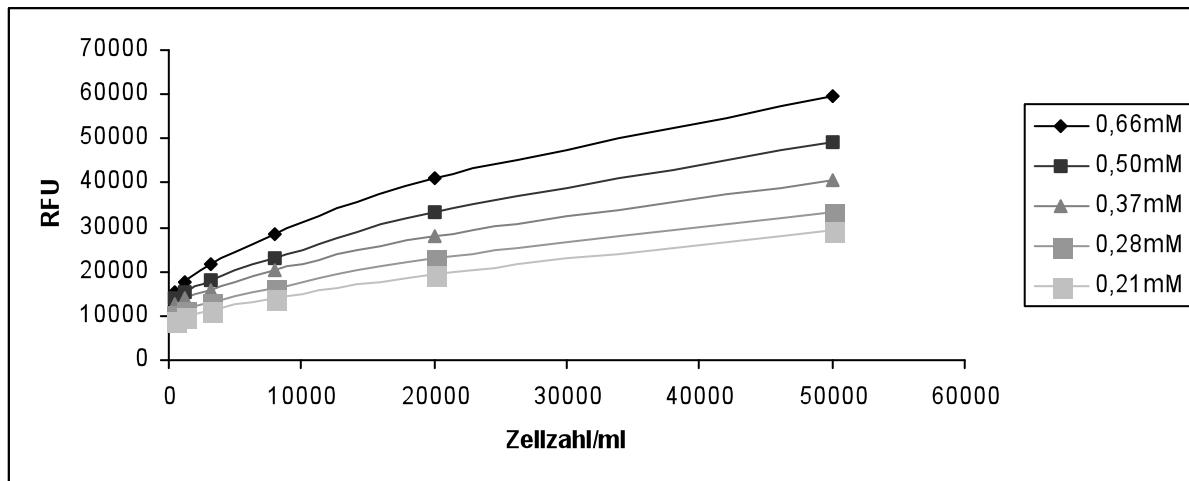


Abbildung 10: Korrelation von Zellzahl und RFU bei Resazurinkonzentrationen von 0,21-0,66mM, Inkubationszeit 1 Stunde.

Im Hauptversuch wurde die Fluoreszenz im Verlauf der 21-tägigen Kulturdauer bei einer Resazurinkonzentration von 0,44mM mit einer Inkubationszeit von einer Stunde gemessen. Bei diesen Verlaufsmessungen sah man deutlich, dass die Fluoreszenzwerte mit der Zunahme der Zellzahl stetig anstiegen. Dabei zeigte sich, dass eine Bedeckung des Flaschenbodens mit Zellen von ca. 80% am letzten Messtag einer relativen Fluoreszenz von ca. 24000 RFU entsprach.

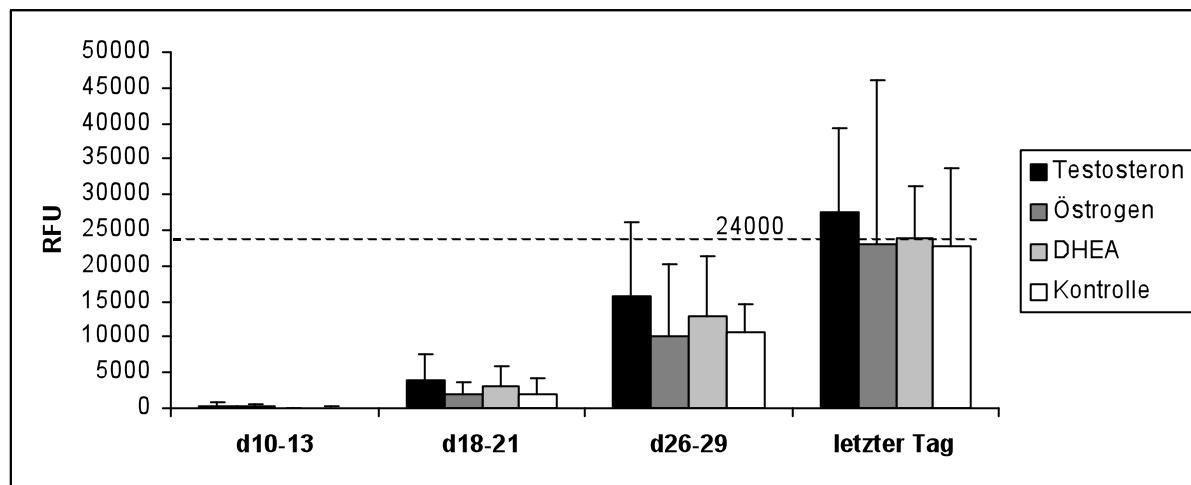


Abbildung 11: Verlaufsmessung des Zellwachstums mittels Resazurinreduktionstest an vier Messzeitpunkten während der 4-5 wöchigen Kulturdauer, 0,44mM Resazurin, 1 Stunde Inkubationsdauer

Die am letzten Tag der Kulturdauer manuell ausgezählte Zellzahl einer Population korrelierte zu 68% mit dem gemessenen Fluoreszenzwert derselben Population. Dabei muss beachtet werden, dass die Zellzahl nur den Mittelwert aus mehreren ausgezählten Zellkulturflaschen darstellt, wobei die Fluoreszenz immer nur bei den Zellen einer Einzelkulturflasche gemessen wurde.

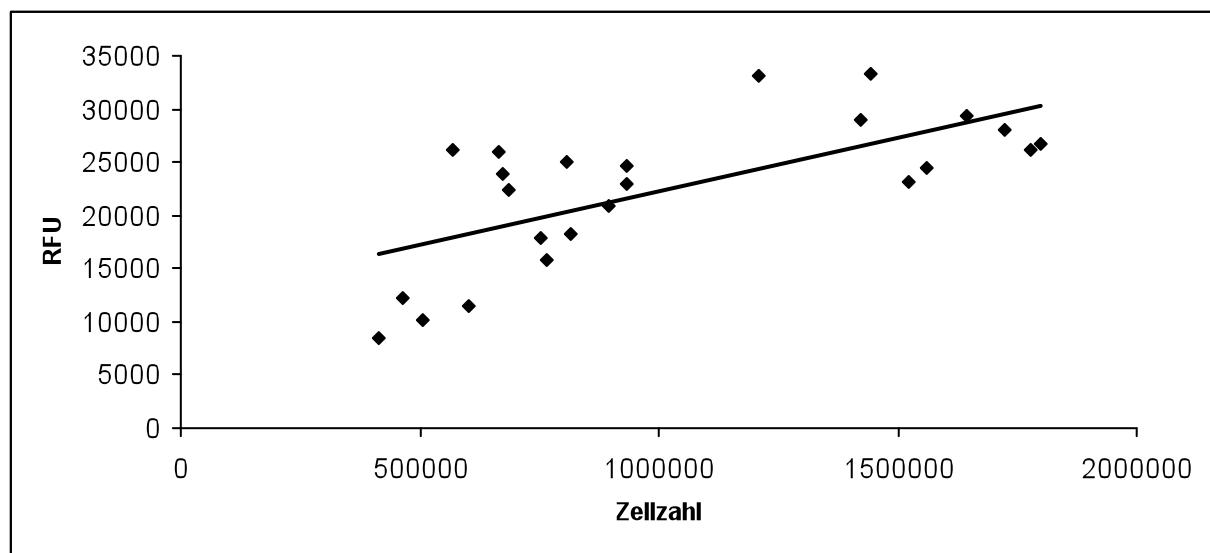


Abbildung 12: Korrelation zwischen relativer Fluoreszenz (RFU) und manuell ausgezählter Zellzahl nach Behandlung mit Resazurin, Daten aus dem laufenden Hauptversuch

4.1.3. Zellauszählung

Bei Auszählung der abtrypsinierten Zellen zeigten sich höhere Zellzahlen nach Kultivierung mit Testosteron (1,44 mal mehr im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe) und DHEA (1,24 mal mehr im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe), wohingegen die Zellzahl unter Östrogenbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe konstant blieb.

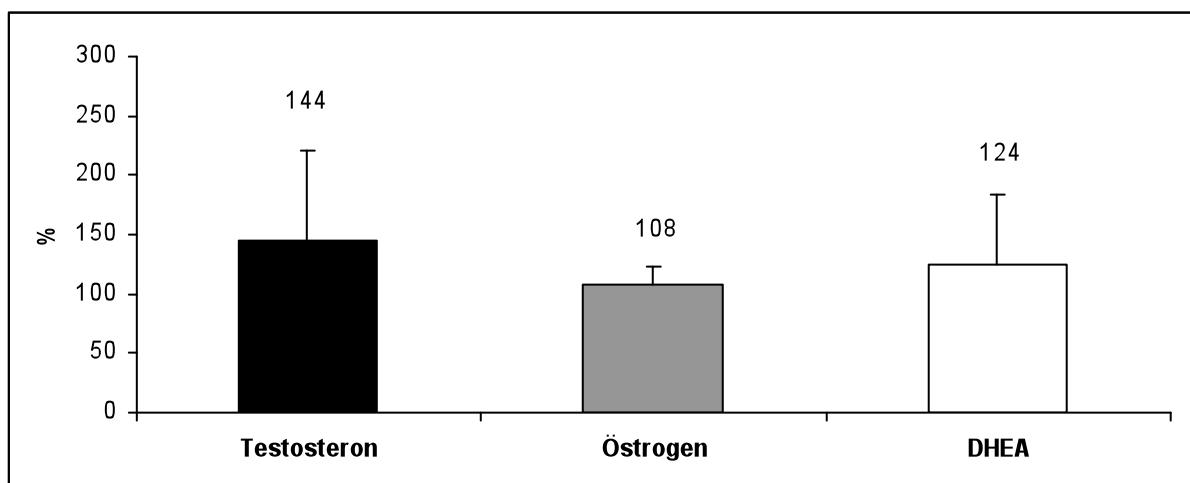


Abbildung 13: Zellzahl normiert zur Kontrollgruppe bei 80%iger Konfluenz des Zellkulturflaschenbodens (n=8)

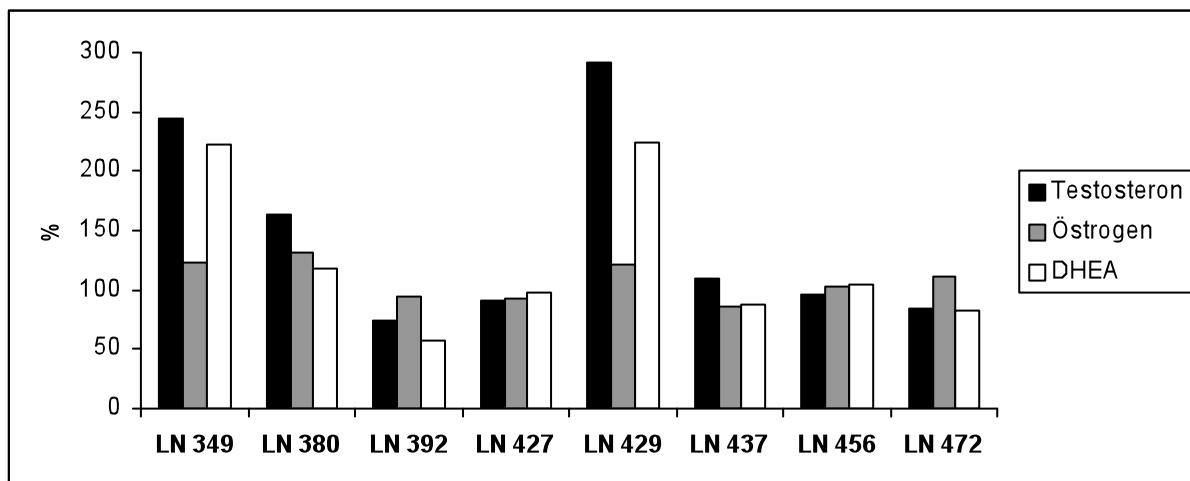


Abbildung 14: Individuelle Übersicht sortiert nach Spendern über die Zellzahl aller verwendeten Zellpopulationen normiert zur Kontrollgruppe bei 80%iger Konfluenz des Zellkulturflaschenbodens (n=8)

Bei genauerer Betrachtung lassen sich die verwendeten Zellpopulationen in zwei Gruppen einteilen. Eine Gruppe enthält Zellen, die hormonsensibel sind (LN349, LN380, LN429), die andere Gruppe spricht nicht auf Hormoneinwirkung an (LN392, LN427, LN437, LN456, LN472). Bei der hormonsensiblen Gruppe wird durch Testosteron (2,33- fach) und DHEA (1,88- fach) eine Zunahme der Zellzahl in Bezug auf die Kontrollgruppe bemerkt, Östrogen zeigt keine Wirkung - die Zellzahl bleibt nahezu konstant. Die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. In der nicht- hormonsensiblen Gruppe bleibt die Zellzahl unabhängig von der Hormonart konstant.

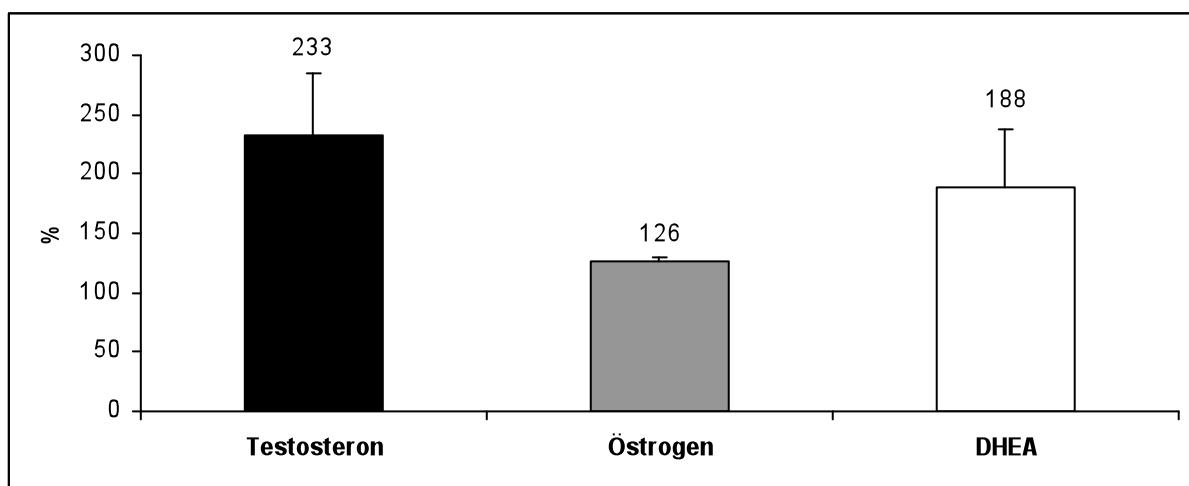


Abbildung 15: Höhere Zellzahl unter Testosteron- und DHEA- Einwirkung in der hormonsensiblen Gruppe (n=3) jeweils normiert zur unbehandelten Kontrollgruppe

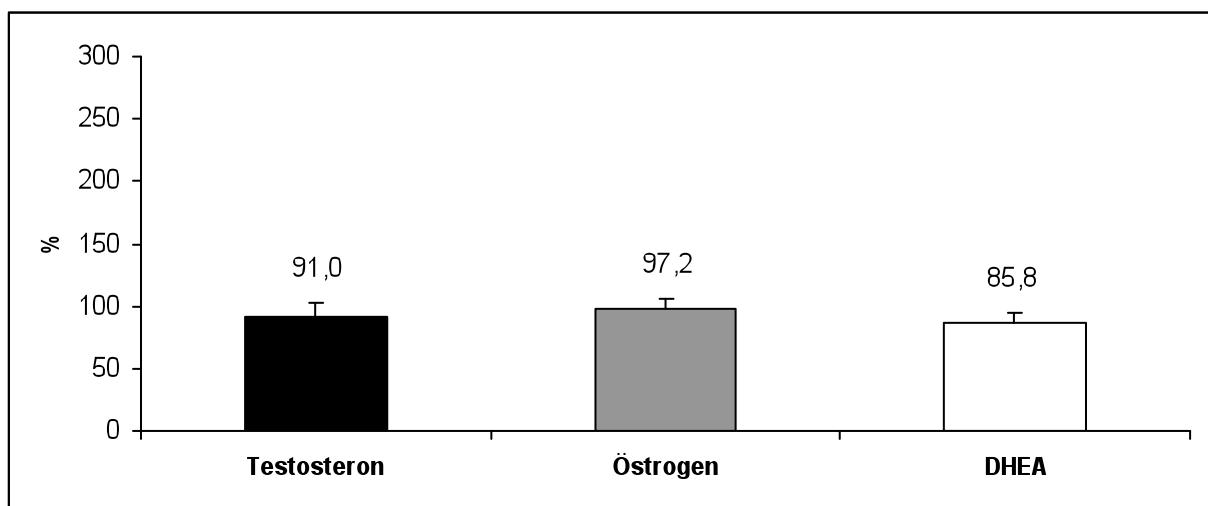


Abbildung 16: Konstant bleibende Zellzahlen in der nicht- hormonsensiblen Gruppe (n=5) jeweils normiert zur unbehandelten Kontrollgruppe

4.2. Differenzierungsphase

4.2.1. Makroskopie und DMMB- Färbung

Nach einer Differenzierungsphase von drei Wochen hatten sich die Zellen zu kleinen Knorpelaggregaten geformt. Makroskopisch ähnelte die glatte, gelbliche Oberfläche der Aggregate Knorpelgewebe. Nach Anfärbung der feingeweblichen Schnitte mit DMMB konnte man die lila Anfärbung der extrazellulären Knorpelmatrix erkennen. Dabei war besonders das Zentrum der Aggregate deutlich lila gefärbt, die Peripherie zeigte sich blau und damit frei von hyaliner Knorpelmatrix. Im Gegensatz dazu war an Tag 0 noch kein hyaliner Knorpel nachzuweisen. Im Größenvergleich zwischen den einzelnen Aggregaten konnte man keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Hormonbehandlungen feststellen (verblindete Untersuchung von zwei unabhängigen Untersuchern). In der Färbung mit DMMB ließen sich bei Aggregaten aller Hormongruppen gleichermaßen Glykosaminoglykane nachweisen.

4.2.2. Immunhistochemie für Kollagen Typ II

Mittels immunhistochemischer Anfärbung konnte man an Tag 21 bei allen Zellpopulationen Kollagen Typ II nachweisen. Dabei konnte man wie schon bei der DMMB-Färbung erkennen, dass sich das Zentrum der Aggregate regelmäßig färbte, die Peripherie jedoch ungefärbt blieb.

Als Ausgangspunkt diente wieder Tag 0: Das Zellpellet aus MSCs wies keine Kollagen- Typ- II- haltige Matrix auf. In Bezug auf die Kollagenproduktion ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Hormongruppen nachweisen.

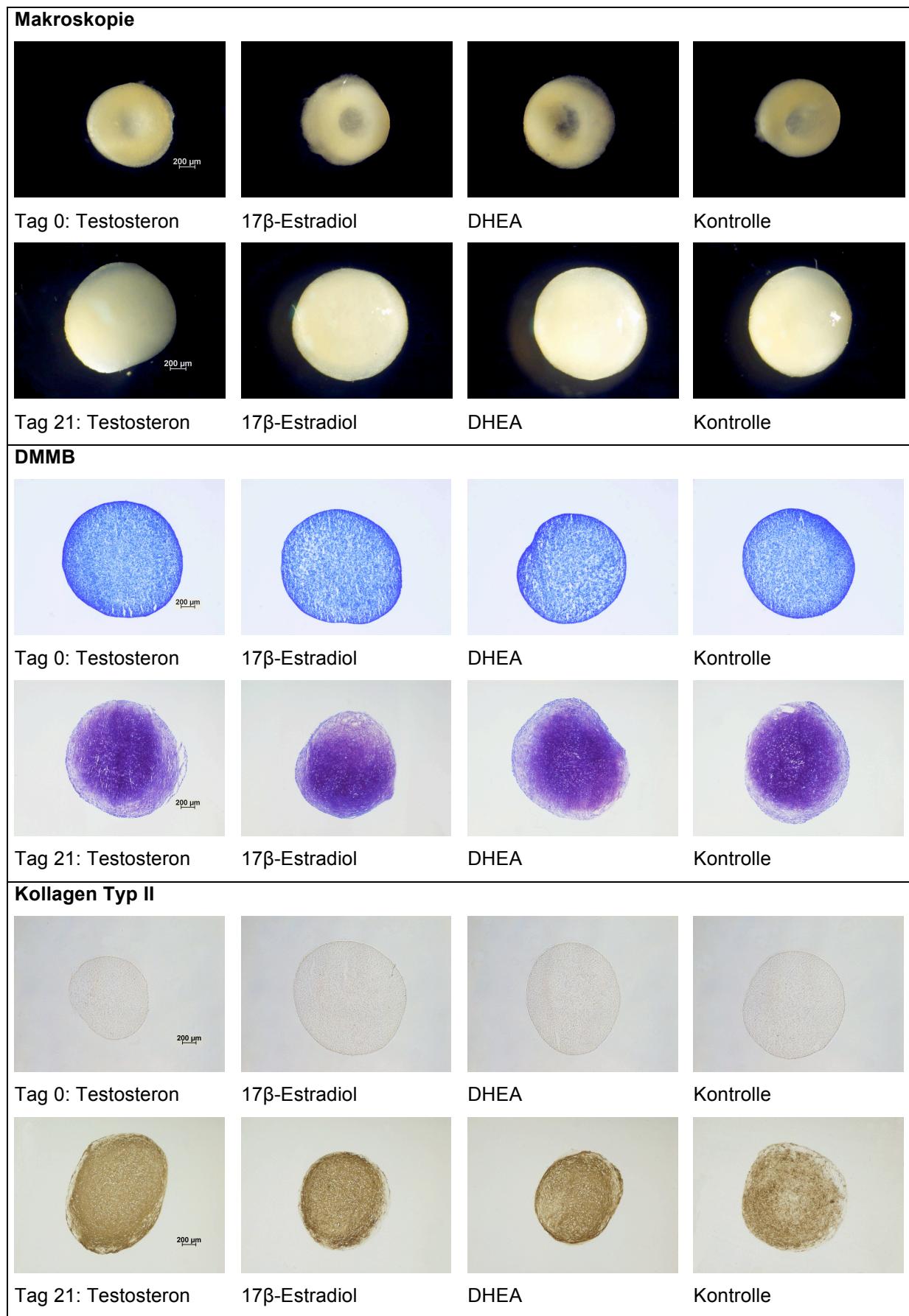


Abbildung 17: Makroskopischer Aspekt der Zellpellets nach 21tägiger Kultur in hormon-freiem Medium.

Die Vorkultivierung erfolgte in den jeweiligen hormonsubstituierten Medien (10-7 M: Testosteron, 17 β -Estradiol, DHEA, Kontrolle). DMMB- Färbung und Immunhistochemie für Kollagen Typ II an Tag 0 und Tag 21, 4x vergrößert dargestellt

4.2.3. DNA- Bestimmung und Kollagen Typ II ELISA

Der DNA-Gehalt der einzelnen Proben betrug durchschnittlich 6,03 μ g/ml.

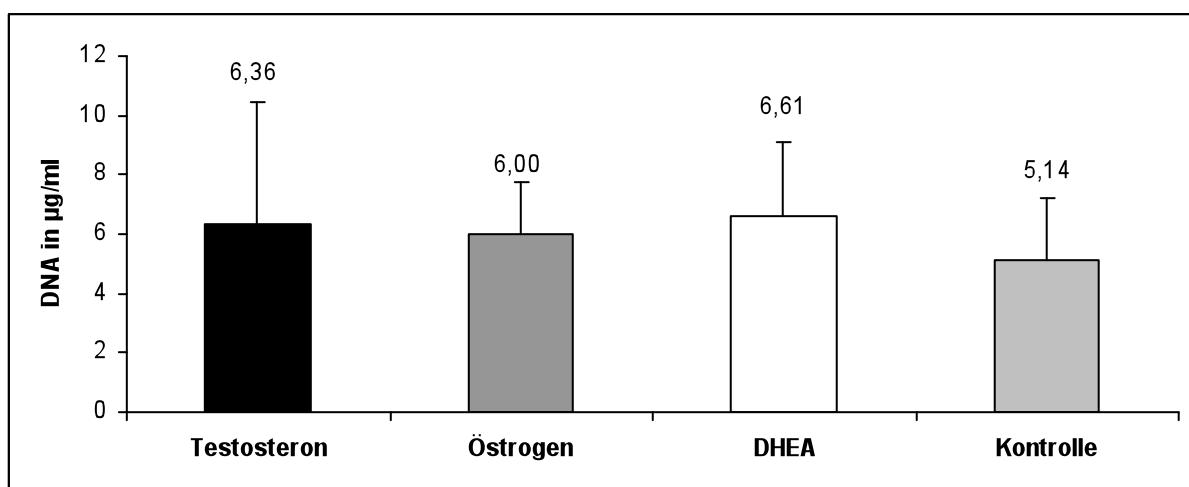


Abbildung 18: DNA-Gehalt der Zellpopulationen nach 21- tägiger Kulturdauer in hormonfreiem Medium, Vorkultivierung mit angegebenem Hormonzusatz (n=5).

Der Kollagen Typ II Gehalt der einzelnen Zellpopulationen unterschied sich nicht durch die Vorkultivierung mit Hormonzusatz und betrug im Durchschnitt 9,26 μ g/ml.

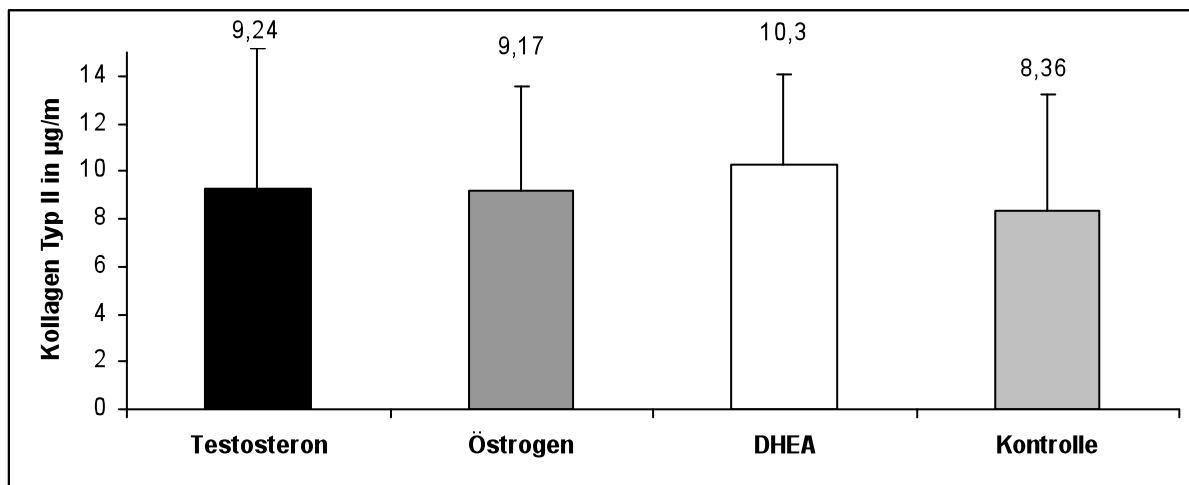


Abbildung 19: Kollagen Typ II Gehalt der Zellpopulationen (n=5)

Um die Syntheseleistung pro Zelle zu untersuchen, wurde der Quotient Kollagen Typ II Gehalt/ DNA Gehalt gebildet und mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Kollagen Typ II Produktion unter Hormoneinfluss nicht änderte. Tendenziell konnte eine Zunahme der Knorpelmatrixsynthese unter Testosteron- und DHEA- Einfluss (107% bzw. 110%) beobachtet werden, wogegen die Kollagensynthese unter Östrogeneinfluss gleich blieb. Diese Effekte erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

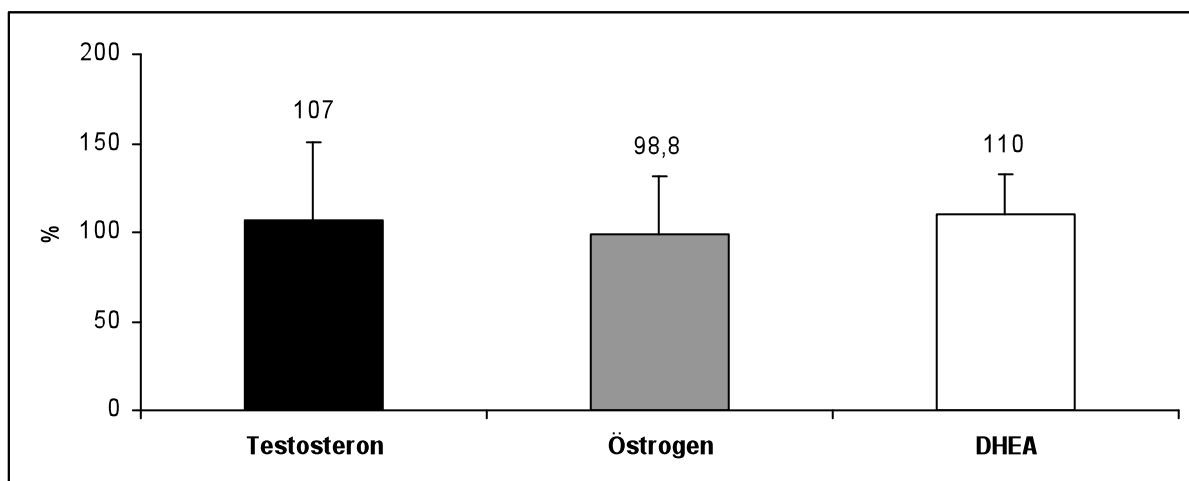


Abbildung 20: Kollagen Typ II- Gehalt in Abhängigkeit von der gebildeten DNA bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe, n=5

4.2.4. Hormonrezeptoren

Es lassen sich bei allen Zellpopulationen sowohl bei den an Tag 0 durch Zentrifugation von MSCs gebildeten Zellpellets als auch an Tag 21 bei den zu hyalinem Knorpel differenzierten Aggregaten zellständige Rezeptoren für Testosteron und Östrogen (AR, ER α und ER β) nachweisen. Quantitative Unterschiede in den einzelnen Hormongruppen lassen sich dabei nicht erkennen.

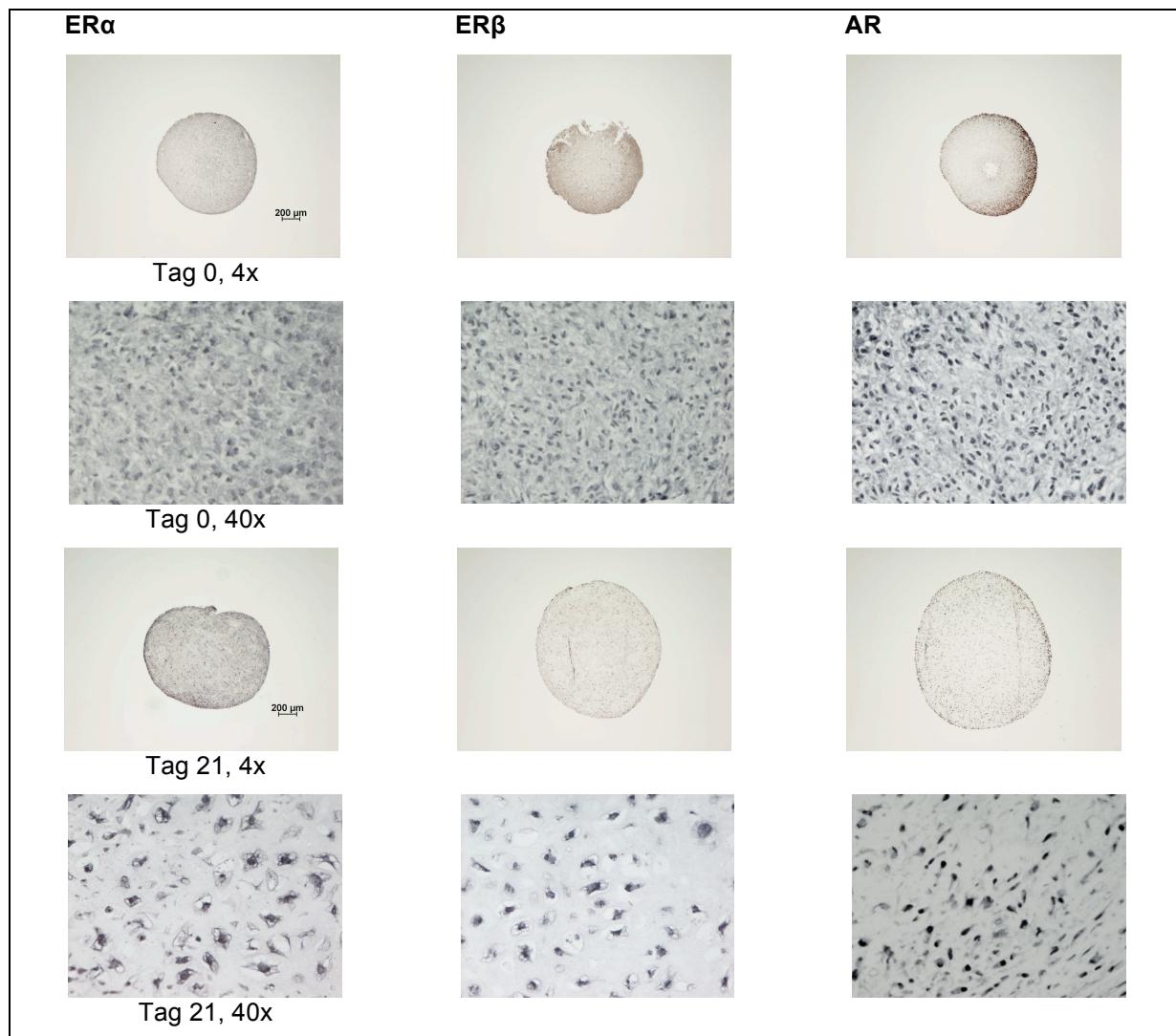


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung für Östrogen- und Androgenrezeptoren an Tag 0 und Tag 21 der Differenzierungsphase, jeweils 4x und 40x vergrößert

5. Diskussion

Mesenchymale Stammzellen können zu verschiedenen mesenchymalen Gewebsarten differenzieren [22] - eine Fähigkeit, die sich das Tissue Engineering bei der in vitro Herstellung von Knorpelgewebe zu Nutze macht. Zur Behandlung arthrotischer Knorpeldefekte soll Gelenkknorpel entstehen, der den biomechanischen Ansprüchen menschlicher Gelenke standhält. Dabei muss berücksichtigt werden, dass in vivo aus embryonalen Zellen funktionelles Gewebe entsteht - in vitro dagegen muss eine Vielzahl von Faktoren vorhanden und diffizil aufeinander abgestimmt sein, um eine ähnliche Funktionalität zu erreichen. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss von Steroidhormonen auf die Chondrogenese untersucht, da bekannt ist, dass Steroidhormone sich auf die Knochen- und Knorpelbildung während des Wachstumsprozesses sowie auf die Entstehung von Arthrose auswirken [27, 28, 31].

Für die Experimente dienten Knochenmarkszellen von 19- 45- jährigen Männern. Weibliche Zellen wurden bewusst nicht verwendet, da der weibliche Hormonhaushalt in Abhängigkeit von Alter und Menstruationszyklus schwankt. Konstante Versuchsbedingungen wären hierunter nicht zu gewähren. Bei Männern der untersuchten Altersgruppe gingen wir von homogeneren Ausgangsbedingungen in Bezug auf den Hormonstatus aus. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Plasmakonzentrationen von Geschlechtshormonen auch bei Männern nicht gleich sind. Unter anderem ändert sich das endokrinologische Profil mit dem Alter. Im Alter zwischen 39- 70 Jahren nehmen freies Testosteron um 1,2% und DHEA um 3,1% pro Jahr ab, während die Östrogenkonzentration konstant bleibt [35]. Neben dem Alter gibt es weitere Faktoren, die einen Einfluss auf den männlichen Hormonhaushalt haben. Einen niedrigeren Testosteronspiegel weisen Patienten mit schweren Allgemeinerkrankungen wie Malignomen auf. Auch kardiale Erkrankungen sowie langjähriger Alkoholkonsum und Adipositas scheinen mit erniedrigten Spiegeln einher zu gehen. Dagegen können einige Medikamente wie β - Blocker, Glukokortikoide und Psychopharmaka zu erhöhten Testosteronkonzentrationen führen [36].

Aber nicht nur in Bezug auf den Hormonausgangsstatus der verwendeten Zellen spielt das Alter der Patienten für den Versuchsaufbau eine große Rolle. Caplan be-

schreibt eine altersabhängige Abnahme der MSC- Konzentration in der durch Knochenmarkpunktion gewonnenen Zellsuspension. Während im Alter bis zu 20 Jahren noch eine von 100.000 Knochenmarkszellen eine mesenchymale Stammzelle ist, ist es bei einem Dreißigjährigen nur noch eine von 250.000 und bei einem Fünfzigjährigen nur noch eine von 400.000 Zellen. Die mit dem Alter abnehmende Teilungsfähigkeit von MSCs zeigt sich auch in einer verzögerten Kallusbildung bei der Frakturheilung älterer Menschen [22]. Diese Betrachtungen stellten einen weiteren Anlass dar, in unserem Versuchsaufbau die Altersgruppe in möglichst engen Grenzen zu halten.

Somit sind die Ausgangsbedingungen trotz Einschränkung von Alter und Geschlecht bei der Patientenauswahl nicht als homogen einzustufen. Umso interessanter war die offenkundige Separierung der Spenderzellen in hormonsensible und hormoninsensible Zellen. Bei den hormonsensiblen Zellen zeigten sich eindeutige Tendenzen zugunsten einer erhöhten Proliferationsrate bei den mit Testosteron und DHEA behandelten Zellen. Die fehlende signifikante statistische Unterscheidung mag in der durch die Separierung bedingten geringen Probenzahl ($n=3$) begründet sein. Eine alternative Zellquelle zu diesem Modell ist das Verwenden von klonalen Zelllinien. Hiermit entfernt man sich jedoch zugunsten von weniger variablen Ergebnissen von einem realitätsnahen Modell. Außerdem ist die kommerzielle Verfügbarkeit eines Zellklones für dieses Forschungsgebiet zurzeit nicht gegeben.

Eine weitere Schwierigkeit im Versuchsaufbau stellte die Tatsache dar, dass nur native Zellen verwendet wurden, das heißt die Zellen wurden nicht vorpassagiert. Damit sollte vermieden werden, dass die Zellen sich mit vermehrter Passage dedifferenzieren. In der Literatur herrscht Uneinigkeit, bis zur welchen Passage die ursprüngliche Zellfunktion gewährleistet ist [37], Vorversuche aus unserer Arbeitsgruppe weisen jedoch auf eine beginnende Dedifferenzierung nach bereits einmaliger Passage hin. Dieses Verfahren schränkte die Auswahl der Spender ein, so dass nur besonders zellreiche OP- Punkte verwendet werden konnten, um für den Versuch eine genügende Anzahl an Zellkulturflaschen anlegen zu können. Vier von neun in der Differenzierungsphase angesetzten Zellpopulationen mussten verworfen werden, da die Zellen kein ausreichendes Wachstum zeigten. Eine Infektion des Mediums mit Pilzen oder anderen Erregern als Erklärung dafür wurde nicht beobachtet.

Für die Gewinnung, Aufbereitung und Proliferation der mesenchymalen Stammzellen wurde nach der in der aktuellen Literatur beschriebenen Methodik vorgegangen [24, 38]. Um die Adhäsion der Zellen am Kulturflaschenboden zu verstärken und so das Zellwachstum zu fördern, enthielt das Zellkulturmedium 10% fetales Kälberserum. Testosteron-, 17 β -Estradiol - und DHEA- Konzentrationen im fertigen Stammzellmedium wurden bestimmt, um einen daraus entstehenden Einfluss auf den Versuchsaufbau auszuschließen.

Wir entschieden uns für Testosteron-, 17 β -Estradiol -, und DHEA- Konzentrationen von 10^{-7} M. Bei normalen Plasmakonzentrationen für Testosteron und Östrogen im Bereich von 10^{-8} M bei adulten Männern und pharmakologisch erreichbaren Konzentrationen von 10^{-7} M schien uns diese Hormonkonzentration als sinnvoll. In der Literatur finden sich bei ähnlichen Versuchen mit Osteoblasten Hormonkonzentrationen von 10^{-8} M bis 10^{-9} M [37, 39].

In einem Nebenversuch wurde versucht, das Abschätzen der Zellzahl der sich in einer Zellkultur befindlichen mesenchymalen Stammzellen zu objektivieren. Bislang wurde die Proliferationsphase der MSCs beendet, sobald eine 80%ige Konfluenz der Zellen auf dem Zellkulturflaschenboden feststellbar war. Das Zellwachstum und die Vitalität der Zellen konnten während der Proliferationsphase nicht objektiv nachvollzogen werden, ohne die Zellen mittels Trypsin vom Flaschenboden zu lösen und auszuzählen. Um das zu vermeiden, wurde die Reduktion von Resazurin (in der Literatur auch als alamar blue bekannt) zu dem Fluoreszenzfarbstoff Resorufin durch MSCs untersucht. Der Resazurinreduktionstest wird seit ungefähr 50 Jahren dazu genutzt, bakterielle Kontamination von Milch oder die Qualität von Spermien zu untersuchen [34, 40]. Gegenüber anderen Tests mit ähnlichen Spannweiten bietet diese Verfahren folgende Vorteile: Im Gegensatz zum Tymidin- Einbau- Assay müssen keine radioaktiven Produkte verwendet werden. Im Vergleich zum MTT- Test ist das Redoxpotential von Resazurin höher, als das des im MTT- Test verwendeten Tetrazoliumsalzes, wodurch man von einer geringeren Interaktion mit der Atmungskette und damit von einer geringeren Gefahr eines Zellschadens durch Resazurin ausgeht [41]. Wie ansatzweise in der Literatur beschrieben [34], konnten auch wir eine zytotoxische Eigenschaft von Resazurinkonzentrationen im Bereich von 0,1mM bis 1mM mit Hilfe eines Life- Dead- Assays verneinen.

Bei der indirekten Bestimmung der Zellzahl während der Proliferation von Fibroblasten durch diese Methode werden 100 bis 20.000 Zellen pro well einer 96- well- Platte als sinnvoll beschrieben. Inkubationszeiten von 2 bis 8 Stunden weisen eine Korrelation von über 99% von Zellzahl und gemessener Fluoreszenz auf. Die Inkubationszeit soll abhängig von der Anzahl der Zellen angepasst werden, wobei sehr niedrige Zellzahlen auch Inkubationszeiten von über 8 Stunden benötigen [41]. Wir konnten unter Austestung verschiedener Resazurinkonzentrationen feststellen, dass Zellzahl und Fluoreszenz bei Konzentrationen von 0,21mM bis 0,66mM Resazurinlösung und Zellzahlen von 500- 50.000 pro well bei einer Inkubationszeit von einer Stunde hoch signifikant miteinander korrelierten.

Um die Proliferationsphase der mesenchymalen Stammzellen verfolgen zu können, wurde der Resazurinreduktionstest mit einer Konzentration von 0,44mM an einer markierten Zellkulturflasche der jeweiligen Hormongruppe einer Zellpopulation einmal wöchentlich durchgeführt. Das Wachstum und die Vitalität der Zellen konnte so schrittweise verfolgt werden. Allerdings zeigten im Hauptversuch die Messungen eine große Streuung, so dass die Verlaufsmessung nur eine qualitative Abschätzung der Zellproliferation zuließ. Bei Versuchsterminierung nach 4- 5 Wochen zeigte sich, dass eine Bedeckung des Flaschenbodens mit Zellen von ca. 80% am letzten Messtag bei den von uns verwendeten Einstellungen einer relativen Fluoreszenz von ca. 24.000 entsprach. Die zu diesem Zeitpunkt manuell ausgezählte Zellzahl einer Population korrelierte zu 68% mit dem gemessenen Fluoreszenzwert derselben Population. Hervorzuheben ist dabei, dass die Zellzahl nur den Mittelwert aus mehreren ausgezählten Zellkulturflaschen darstellt, wobei die Fluoreszenz immer nur bei den Zellen einer Einzelkulturflasche gemessen wurde.

Der Resazurinreduktionstest erwies sich somit als gute Methode zu Abschätzung der Proliferationsrate. Ein Fluoreszenzwert konnte ermittelt werden, der mit der 80%igen Konfluenz der Zellen am Flaschenboden übereinstimmte. Dadurch stand ein objektives Verfahren für die laboreigenen Versuchsreihen mit MSCs zur Verfügung, das den individuellen Blick durch das Mikroskop beim Festlegen des Terminierungszeitpunktes für die Zellkultur objektivierte. Außerdem konnte die Aktivität und das Zellwachstum der Kultur über die ganze Proliferationsphase beobachtet werden. Die Genauigkeit des Verfahrens erreicht jedoch nicht die eines Thymidin- Einbau- As-

says, mit dem der Zellumsatz direkt gemessen werden kann. Eine Schwierigkeit bestand darin, die Proliferationsrate der Stammzellen abzuschätzen und die Inkubationszeit des Resazurins entsprechend anzupassen. Hierbei ist unklar, in wieweit die Zellen durch die Hormoneinwirkung in ihrer Stoffwechselleistung beeinflusst wurden.

Die Proliferation der mesenchymalen Zellen gelang problemlos. Nach ca. einer Woche hatten sich mehrere colony forming units gebildet. Die 80%ige Bedeckung des Zellkulturbodens mit MSCs war bei allen Populationen nach ca. 5 Wochen erreicht. Stichprobenartig wurden bei einer Zellpopulation CD- Oberflächenproteine bestimmt, um zu bestätigen, dass es sich bei den verwendeten Zellen tatsächlich um MSCs handelte und um eine eventuelle Veränderung immunhistologischer Charakteristika durch die verwendeten Sexualhormone zu bemerken. Für mesenchymale Stammzellen gibt es keinen einheitlichen Stammzellmarker. Es herrscht jedoch Einigkeit darüber, dass bei einem gewissen Zusammenspiel von Oberflächenproteinen von dem Vorhandensein mesenchymaler Stammzellen ausgegangen werden kann: MSCs tragen die Oberflächenantigene SH2, 3 und 4 [42], Stro-1 [43], sowie für CD13, CD29, CD44, CD49, CD71, CD90, CD105 (SH2), CD106, CD120a, CD124 und CD166. CD14, CD34 und CD45 fehlen [25, 44, 45]. Allen MSCs ist dabei gemeinsam, dass sie in der Zellkultur als adhärente Zellen wachsen und dass sie je nach Stimulus zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipoblasten differenzieren können. Trotzdem ist zu bemerken, dass die bisweilen uneinheitliche Charakterisierung der mesenchymalen Stammzelle von Labor zu Labor auch für unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit sorgt [44]. Weitere Untersuchungen beschäftigen sich nicht nur mit dem Phänotyp der Zellen, der über die Oberflächenproteine beschrieben wird, sondern auch mit deren Genotyp. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zellen sich je nach Entnahmestelle (Knochenmark, peripheres Blut, Nabelschnurblut) und Kultivierungsart genetisch unterscheiden [46].

Wir haben mittels Durchflusszytometrie eine Auswahl an entsprechenden Oberflächenstrukturen untersucht. Unsere Zellen waren positiv für: CD29, CD44, CD105, und CD166 und negativ für CD14 und CD34. Daraus schlossen wir, dass es sich um MSCs handelte und dass die Zellen nicht durch die Hormone in ihren charakteristischen Oberflächenstrukturen verändert worden waren.

Die Zellzahl am Ende der Proliferationsphase zeigte große Variationen zwischen den einzelnen Zellpopulationen. Wenn man die Ergebnisse der Einzelgruppen jedoch kombiniert, steigert Testosteron das Zellwachstum 1,44- fach und DHEA 1,24- fach im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Bei der großen Varianz der Ergebnisse zwischen den einzelnen Zellspendern wäre es jedoch falsch, daraus direkt einen wachstumsfördernden Einfluss von Testosteron und DHEA abzulesen. Wir haben uns die Zellzahlen genauer angesehen und kamen zu folgender Interpretation: Die acht verwendeten Zellpopulationen ließen sich in zwei Gruppen einteilen, wovon die erste Gruppe generell ein Ansprechen auf Sexualhormone zeigte, die zweite Gruppe blieb in der Zellzahl konstant und zeigte sich somit als unempfindlich für Hormoneinfluss. Bei den drei Zellpopulationen, die auf Hormone reagierten, zeigte sich unter Testosteron eine Zunahme der Zellzahl um das 2,33- fache, unter DHEA Einfluss um das 1,88- fache. Die beiden am stärksten auf Testosteron ansprechenden Zellpopulationen (LN349 und LN429) stammten von den beiden jüngsten Zellspendern (19 und 20 Jahre) in der Versuchsreihe. Interessanterweise blieb die Zellzahl unter Östrogeneinfluss bei allen Zellpopulationen ohne nennenswerte interindividuelle Unterschiede konstant.

Das unterschiedliche Ansprechen auf Hormone kennt man von der unterschiedlichen Wirksamkeit einer Hormontherapie bei Frauen in der Postmenopause [47]. Aber auch bei in vitro Versuchen mit Sexualhormonen sind große Varianzen der Ergebnisse bekannt. Leskelä untersuchte die Wirkung von Östrogen und Testosteron auf die Osteogenese von MSCs. Bei seinen Versuchen wurden vorpassagierte MSCs mit verschiedenen Hormonkonzentrationen unter Dexamethasoneinfluss (Induktion der Osteogenese) kultiviert und zur Erfassung der Osteogeneseleistung alkalische Phosphatase und Calcium mittels spezieller Assays gemessen. Dabei wurden Zellen von Frauen und Männern verwendet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Zellspendern waren dabei unabhängig von Alter und Geschlecht so groß, dass keine generalisierte Aussage zur Auswirkung der beiden Sexualhormone getroffen werden konnte. Auf der Suche nach einer Erklärung für die interindividuellen Unterschiede wurden die Spender genetisch analysiert. Es zeigte sich, dass eine höhere osteogene Differenzierungskapazität mit dem Fehlen eines Restriktionslängenpolymorphismus des ER α - Rezeptors zusammenhing [39]. Auch Holzer beschreibt in einem ähnlichen Versuchsaufbau, dass die Wirkung von Östrogen auf die Osteogenese von

MSCs gering ist und dazu abhängig vom Zellstamm und den Kulturbedingungen [37]. Bezuglich der Wirkung von Testosteron auf die Proliferation von MSCs konnten Gupta und Kollegen keinen Einfluss erkennen [48], zu bemerken ist jedoch der zu unserem Experiment abweichende Ansatz für die Induktion der osteogenen Differenzierung.

Aufgrund der Verblindung der Proben war retrospektiv der hormonelle Status der Spender zum Zeitpunkt der Zellentnahme nicht mehr zu eruieren. Ein Faktor, der zukünftig vor allem bei den physiologischen hormonellen Schwankungen von weiblichen Spendern beachten werden muss.

Neben dem Effekt der Sexualhormone auf die Proliferationsphase mesenchymaler Stammzellen wurde auch die Auswirkung der hormonellen Vorbehandlung auf die Chondrogenese der MSCs untersucht. Zu unterstreichen ist, dass die Differenzierung ohne zusätzlichen Sexualhormoneinfluss stattfand. Verwendet wurde das etablierte chondrogene Differenzierungsmedium, das Dexamethason in einer Konzentration von 10^{-7} M und als wichtigsten Wachstumsfaktor TGF β in einer Konzentration von 10ng/ml enthält [24, 26, 49]. Dexamethason sorgt dabei für eine gesteigerte Genexpression von Matrixproteinen wie Aggrecan [50], während TGF β die Chondrogenese beschleunigt und die Kollagenbildung steigert [51].

Nach einigen Tagen begannen sich aus den Stammzellpellets dreidimensionale Konstrukte zu formen. An Tag 21 ähnelten die entstandenen Aggregate nicht nur makroskopisch Knorpelgewebe: Eine Färbung mit DMMB visualisierte die in der Matrix enthaltenen Glykosaminoglykane, immunhistochemisch ließ sich die Bildung von Kollagen Typ II bestätigen, während der ELISA eine durchschnittliche Kollagen Typ II Produktion von 9,26 μ g/ml zeigte. Es konnte somit die Bildung von hyalinem Knorpel angenommen werden.

Studien, bei denen das Kulturmedium konstante Hormonkonzentrationen aufweist, kommen zu verschiedenen, teilweise widersprüchlichen Ergebnissen in Bezug auf die Syntheseleitung von Chondrozyten. Am Kiefergelenk der Ratte sorgt Östrogen für eine niedrige Matrixproduktion sowie eine Dickenabnahme des Gelenkknorpels [52]. Testosteroneinwirkung auf Rattenchondrozyten steigert die Kollagen Typ II Produktion nach Schwartz und Kollegen nur bei Zellen von männlichen Versuchstieren [53],

während Ergebnisse aus derselben Forschungsgruppe eine ähnliche Wirkung von Östrogen bei weiblichen Tieren sehen [54]. Auch Kinney und Kollegen beschreiben einen sexuellen Dimorphismus humaner Chondrozyten bezüglich der Wirkung von 17 β -Östradiol. Im Gegensatz zu Chondrozyten männlicher Spender zeigten weibliche Chondrozyten eine verbesserte Knorpelproduktion nach temporärer Kultivierung mit Östrogen [55]. Einen weiteren Aspekt der Wirkung von Steroidhormonen zeigt eine Studie von Sun und Kollegen. Sie kultivierten neonatale Rattenchondrozyten mit DHEA, wobei sie einen protektiven Einfluss von DHEA auf die Entstehung von Knorpelschäden durch gesteigerte Proliferation der Chondrozyten, sowie durch Modifizierung intrazellulärer Signalwege feststellen konnten [56]. Bei dem Vergleich der Ergebnisse aus diesen Studien mit unseren Daten ist vor allem der Unterschied in der Zellart zu beachten. Während die meisten experimentellen Ansätze mit adulten Chondrozyten arbeiteten, benutzen wir in unserem Ansatz chondrogen differenzierte MSCs.

In den in unseren Versuchen untersuchten drei Hormongruppen gab es weder Unterschiede bei der Größe der Aggregate noch in der Zusammensetzung der Matrix, was die qualitative Proteoglykanbildung sowie die qualitative und quantitative Kollagen Typ II Bildung betraf. Dabei darf nicht vergessen werden, dass die Chondrozyten nicht unter Hormoneinfluss kultiviert, sondern lediglich deren Vorstufen vor der Differenzierung vorbehandelt worden waren. Eine solche Vorkultivierung scheint demnach keinen Einfluss auf die spätere Syntheseleistung zu haben. Für eine klinische Anwendung ist dieser Aspekt interessant: Obwohl die Zellen aus vom Spender individuell definierten und vom Untersucher nahezu nicht beeinflussbarem Hormonmilieu kommen, spielt dieses bei der Differenzierung von Chondrozyten aus entnommenen MSCs keine Rolle. Dieser Effekt muss in größerer Fallzahl bestätigt werden und die Experimente auf weibliche Spender ausgeweitet werden. Bei einer dortigen Bestätigung unserer Ergebnisse wäre dies ein entscheidender Schritt für hin zur klinischen Anwendung von Tissue engineering Konstrukten in der Knorpelschadentherapie.

Um genau zu verstehen, was in der Zelle passiert, müssen neben Zellsyntheseleistungen intrazelluläre Signalwege untersucht werden. Wie genau Sexualhormone in der Zelle agieren, ist noch nicht vollständig erforscht. Neben dem klassischen intrazellulären Weg, bei dem das Hormon einen zellkernständigen Rezeptor aktiviert,

welcher für die Transskription der Gene sorgt, werden extrazelluläre Ansatzpunkte diskutiert, über die mittels Signalkaskaden ohne Zelltransskription und Proteinbiosynthese eine zeitlich schnellere Wirkung erreicht werden kann. Diese extrazellulären Mechanismen sollen besonders für mesenchymales Gewebe eine große Rolle spielen. Am besten untersucht ist dabei der Ras/Raf/ERK- Pathway, über den Steroidhormone mittels Mitogen Activated Proteinkinasen (MAPK) mit dem Zellkern interagieren [55, 57]. Die Wirkung von Sexualhormonen auf intrazelluläre Signalkaskaden bei der chondrogenen Differenzierung stellt ein weiteres Forschungsziel unserer Arbeitsgruppe dar.

Wir legten Wert darauf, spezifische Zielstrukturen der Sexualhormone auf zellulärer Ebene sowohl in MSCs als auch in Chondrozyten selbst nachzuweisen. Beide Östrogenrezeptoren sowie der Androgenrezeptor wurden bereits in adulten Chondrozyten der Wachstumsfuge von Röhrenknochen [58-61] und an Gelenkknorpel [32, 62-64] von Menschen und verschiedenen Tieren genetisch durch *in situ* Hybridisierung von mRNA und immunhistochemisch nachgewiesen. Des weiteren wurde bei der Osteogenese von humanen und animalen mesenchymalen Stammzellen an Osteoblasten und osteoblastären Progenitorzellen die Expression von mRNA für Östrogen- und Androgenrezeptoren gezeigt [65-67]. Wang und Kollegen gelang erstmals der Nachweis von mRNA und die immunhistologische Färbung von ER α an mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte [68].

Uns glückte der immunhistochemische Nachweis von ER α , ER β und AR Rezeptoren sowohl in MSCs- Pellets als auch an daraus differenziertem Knorpelgewebe. Der Nachweis der Sexualhormonrezeptoren an zweidimensionalen MSC- Kulturen steht noch aus und stellt im Moment noch eine technische Herausforderung dar.

6. Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen haben das Potential, sich zu verschiedenen Gewebearten zu differenzieren. Die klinische Anwendung von Tissue Engineering Konstrukten zur Sanierung von Knorpeldefekten zeigt aktuell noch keine suffizienten Ergebnisse. Es wird deswegen nach Faktoren gesucht, die eine Verbesserung bewirken können. Ein Effekt von Steroidhormonen auf die Chondrogenese von MSCs ist bekannt. Das hormonelle Milieu sowohl der entnommenen Zellen, wie auch der re-implantierten Konstrukte ist durch den Spender determiniert.

Das Hauptziel dieser Arbeit war herauszufinden, in wieweit Testosteron, 17 β -Estradiol und DHEA sich auf die Proliferation von MSCs und deren nachfolgende chondrogene Differenzierung auswirken. Zusätzlich wurde der Nachweis für das Vorhandsein von spezifischen Steroidhormonrezeptoren in unserem Modell erbracht und ein neues Verfahren zur semiquantitativen Zellzahlbestimmung von MSC-Kulturen etabliert.

Aus menschlichen Knochenmarkszellen von männlichen Spendern wurden MSCs isoliert, unter Hormoneinfluss (Testosteron, 17 β -Estradiol und DHEA) vier Wochen in Zellkulturflaschen kultiviert und nachfolgend analysiert. Hierbei konnte mittels Resazurin-Farbstoff eine semiquantitative Abschätzung der Zellzahl unter Umgehung von zellschädigendem Trypsineinsatz etabliert werden. Es zeigte sich ein vermehrtes, jedoch statistisch nicht signifikantes Zellwachstum unter Testosteron- und DHEA-Einfluss. Zellpopulationen von drei der acht Spender zeigten ein ausgeprägtes Ansprechen auf Testosteron- und DHEA- Gabe. Unter Östrogenbehandlung blieb die Zellzahl durchgehend konstant. Welche Faktoren außer dem Patientenalter die große Varianz der Empfindlichkeit gegenüber den Sexualhormonen zwischen den einzelnen Zellpopulationen wirkten, bleibt unklar. In der Literatur ist dieses Phänomen bekannt. Ein Erklärungsversuch bringt unterschiedliche Genotypen der Hormonrezeptoren ins Gespräch.

Im Anschluss wurde die Differenzierungsphase unter Verwendung eines etablierten chondrogenen Differenzierungsmediums eingeleitet. Nach drei Wochen wurde die

Bildung von hyalinem Knorpel durch Färbung mit DMMB, Immunhistochemie für Kollagen Typ II, sowie einem ELISA für Kollagen Typ II nachgewiesen. Es zeigte sich kein Unterschied in der Syntheseleistung zwischen den einzelnen mit den jeweiligen Sexualhormonen vorbehandelten Gruppen.

Sowohl an MSCs am Ende der Proliferationsphase, als auch an Knorpelaggregaten am Ende der Differenzierungsphase ließen sich Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) sowie der Androgenrezeptor (AR) immunhistochemisch nachweisen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Sexualhormone über definierte Zielstrukturen eine Wirkung auf die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen ausüben. Es bestehen große individuelle Unterschiede im Ansprechen auf die verschiedenen Hormone, wobei gerade in jüngerem Alter Testosteron und DHEA einen wachstumsfördernden Effekt zeigen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Hormonsensitivität der kultivierten mesenchymalen Stammzellen zeigen die Bedeutung der Thematik für das Tissue Engineering auf. Der Hormonstatus der Patienten sollte somit stärker in den Fokus des Interesses rücken und muss für Entscheidungen hinsichtlich OP- Zeitpunkt und Zusammensetzung des Zellkulturmediums beachtet werden.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABC	Avidin biotin complex
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
Aqua dest.	Aqua destillata
AR	Androgenrezeptor
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMEM	Dulbecco's minimal eagles medium
DMMB	1,9-Dimethyl-Methylenblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ER	Estrogen receptor
Erk	Extracellular signal regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
GH	Growth hormone
h	Stunde
IE	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
ITS	Insulin transferrin sodium media supplement
l	Liter

LN	Labornummer
M	Molare Masse
min	Minuten
MMPs	Metalloproteininasen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymal stem cell
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
neg	negativ
PBS	Phosphate buffered saline
pos	positiv
RFU	Relative fluorescence unit
Shc	SRC homology 2 domain containing
SRC	Tyrosinkinase, abgeleitet von sarcoma
TBS	Tris buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TIMPs	Tissue inhibitors of MMPs
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan

Literaturverzeichnis

1. Niethard, F.U., Cartilage substitutes--a topic arthrosis research. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 2002. 140(2): p. 143-4.
2. Roos, E.M., Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. *Curr Opin Rheumatol*, 2005. 17(2): p. 195-200.
3. Statistisches-Bundesamt, *Krankheitskosten 2002*. 2002.
4. Goldring, S.R. and M.B. Goldring, Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2006. 6(4): p. 376-8.
5. Englund, M. and L.S. Lohmander, Risk factors for symptomatic knee osteoarthritis fifteen to twenty-two years after meniscectomy. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(9): p. 2811-9.
6. Poole, A.R., et al., Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(391 Suppl): p. S26-33.
7. Goldring, M.B., Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006. 20(5): p. 1003-25.
8. Li, B. and R.M. Aspden, Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis*, 1997. 56(4): p. 247-54.
9. Buckland-Wright, J.C., J.A. Lynch, and D.G. Macfarlane, Fractal signature analysis measures cancellous bone organisation in macroradiographs of patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1996. 55(10): p. 749-55.
10. Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff, Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 2006. 11: p. 529-43.
11. Iannone, F. and G. Lapadula, The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res*, 2003. 15(5): p. 364-72.
12. Niemeyer, P., et al., Operative treatment of cartilage lesions in the knee joint. *Sportverletz Sportschaden*, 2007. 21(1): p. 41-50.
13. Diduch, D.R., et al., Total knee replacement in young, active patients. Long-term follow-up and functional outcome. *J Bone Joint Surg Am*, 1997. 79(4): p. 575-82.

14. Schneider, T., 10-Jahres-Analyse nach arthroskopischem Gelenkdébridement bei Gonarthrose. *Arthroskopie*;12, 1999: p. 17-21.
15. Jackson, R.W. and C. Dieterichs, The results of arthroscopic lavage and débridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up. *Arthroscopy*, 2003. 19(1): p. 13-20.
16. Steadman, J.R., et al., The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players. *J Knee Surg*, 2003. 16(2): p. 83-6.
17. Kreuz, P.C., et al., Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(11): p. 1119-25.
18. Johnson, L.L., Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(391 Suppl): p. S306-17.
19. Bouwmeester, S.J., et al., Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop*, 1997. 21(5): p. 313-7.
20. Burkart, A.C., P.B. Schoettle, and A.B. Imhoff, [Surgical therapeutic possibilities of cartilage damage]. *Unfallchirurg*, 2001. 104(9): p. 798-807.
21. Brittberg, M., et al., Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 1994. 331(14): p. 889-95.
22. Caplan, A.I., Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 2007. 213(2): p. 341-7.
23. Murdoch, A.D., et al., Chondrogenic differentiation of human bone marrow stem cells in transwell cultures: generation of scaffold-free cartilage. *Stem Cells*, 2007. 25(11): p. 2786-96.
24. Barry, F.P. and J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(4): p. 568-84.
25. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999. 284(5411): p. 143-7.
26. Johnstone, B., et al., In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 1998. 238(1): p. 265-72.
27. Felson, D.T. and Y. Zhang, An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum*, 1998. 41(8): p. 1343-55.

28. Richette, P., M. Corvol, and T. Bardin, Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 2003. 70(4): p. 257-62.
29. Löffler, Biochemie. p. 495-501.
30. Kaufmann, M., Costa, Serban D. und Scharl, Anton (Hrsg.), *Die Gynäkologie*. 2. Auflage ed, ed. S.M.V. Heidelberg. 2006.
31. Karperien, M., B.C. van der Eerden, and J.M. Wit, Genomic and non-genomic actions of sex steroids in the growth plate. *Pediatr Nephrol*, 2005. 20(3): p. 323-9.
32. Ushiyama, T., et al., Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. 7(6): p. 560-6.
33. Dörner, K., *Klinische Chemie und Hämatologie*, ed. Thieme. 2003. 532,541,543.
34. O'Brien, J., et al., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 2000. 267(17): p. 5421-6.
35. Gray, A., et al., Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991. 73(5): p. 1016-25.
36. Harman, S.M., et al., Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *Baltimore Longitudinal Study of Aging*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(2): p. 724-31.
37. Holzer, G., T.A. Einhorn, and R.J. Majeska, Estrogen regulation of growth and alkaline phosphatase expression by cultured human bone marrow stromal cells. *J Orthop Res*, 2002. 20(2): p. 281-8.
38. Lennon, D.P. and A.I. Caplan, Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 2006. 34(11): p. 1604-5.
39. Leskela, H.V., et al., Estrogen receptor alpha genotype confers interindividual variability of response to estrogen and testosterone in mesenchymal-stem-cell-derived osteoblasts. *Bone*, 2006. 39(5): p. 1026-34.
40. Carter, R.A., et al., Assessing the fertility potential of equine semen samples using the reducible dyes methylene green and resazurin. *Arch Androl*, 1998. 40(1): p. 59-66.

41. Voytik-Harbin, S.L., et al., Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998. 34(3): p. 239-46.
42. Haynesworth, S.E., M.A. Baber, and A.I. Caplan, Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 1992. 13(1): p. 69-80.
43. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1, in *Blood*. 1991. p. 55-62.
44. Herzog, E.L., L. Chai, and D.S. Krause, Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 2003. 102(10): p. 3483-93.
45. Foster, L.J., et al., Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation. *Stem Cells*, 2005. 23(9): p. 1367-77.
46. Wagner, W., et al., Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, 2005. 33(11): p. 1402-16.
47. Komulainen, M., et al., Identification of early postmenopausal women with no bone response to HRT: results of a five-year clinical trial. *Osteoporos Int*, 2000. 11(3): p. 211-8.
48. Gupta, V., et al., Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 2008. 296(1-2): p. 32-40.
49. Angele, P., et al., Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng*, 1999. 5(6): p. 545-54.
50. Derfoul, A., et al., Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*, 2006. 24(6): p. 1487-95.
51. Iwasaki, M., et al., Transforming growth factor-beta 1 stimulates chondrogenesis and inhibits osteogenesis in high density culture of periosteum-derived cells. *Endocrinology*, 1993. 132(4): p. 1603-8.
52. Ng, M.C., et al., Effects of estrogen on the condylar cartilage of the rat mandible in organ culture. *J Oral Maxillofac Surg*, 1999. 57(7): p. 818-23.

53. Schwartz, Z., et al., Gender-specific, maturation-dependent effects of testosterone on chondrocytes in culture. *Endocrinology*, 1994. 134(4): p. 1640-7.
54. Nasatzky, E., et al., Sex-dependent effects of 17-beta-estradiol on chondrocyte differentiation in culture. *J Cell Physiol*, 1993. 154(2): p. 359-67.
55. Kinney, R.C., et al., Human articular chondrocytes exhibit sexual dimorphism in their responses to 17beta-estradiol. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. 13(4): p. 330-7.
56. Sun, J.S., et al., The in vitro effects of dehydroepiandrosterone on chondrocyte metabolism. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(3): p. 238-49.
57. Cheskis, B.J., Regulation of cell signalling cascades by steroid hormones. *J Cell Biochem*, 2004. 93(1): p. 20-7.
58. Carrascosa, A., et al., Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990. 70(1): p. 134-40.
59. Abu, E.O., et al., The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82(10): p. 3493-7.
60. Nilsson, L.O., et al., Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(1): p. 370-3.
61. Nilsson, O., et al., Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *J Endocrinol*, 2003. 177(2): p. 319-26.
62. Dayani, N., et al., Estrogen receptors in cultured rabbit articular chondrocytes: influence of age. *J Steroid Biochem*, 1988. 31(3): p. 351-6.
63. Richmond, R.S., et al., Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum*, 2000. 43(9): p. 2081-90.
64. Claassen, H., et al., Immunohistochemical detection of estrogen receptor alpha in articular chondrocytes from cows, pigs and humans: in situ and in vitro results. *Ann Anat*, 2001. 183(3): p. 223-7.
65. Eriksen, E.F., et al., Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 1988. 241(4861): p. 84-6.

66. Arts, J., et al., Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology*, 1997. 138(11): p. 5067-70.
67. Wiren, K.M., A. Chapman Evans, and X.W. Zhang, Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression. *J Endocrinol*, 2002. 175(3): p. 683-94.
68. Wang, Q., et al., Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 347(1): p. 117-23.

Erklärung

Nach § 6 Absatz 5 der Promotionsordnung der Universität Regensburg vom 12.06.2008:

Ich erkläre, dass ich die der Universität Regensburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Einfluss von Steroidhormonen auf die Proliferation und chondogene
Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen**

in der unfallchirurgischen Klinik der Universität Regensburg unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Peter Angele ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg im Juli 2010,

Katharina Ehehalt

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zu Seite standen, herzlich bedanken:

Herrn Prof. Dr. Michael Nerlich, Vorstand der Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg, für die Möglichkeit, diese interessante Arbeit in seiner Klinik anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Peter Angele, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung.

Herrn Dr. Thomas Dienstknecht für sein großes Engagement, mich bei dieser Arbeit zu unterstützen. Die produktiven und unterhaltsamen Diskussionen mit ihm haben die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht.

Herrn Dr. Richard Kujat für die Bereitstellung von Patientenproben, Arbeitsplatz und Materialien.

Dem Laborteam der Unfallchirurgie, insbesondere Frau Daniela Drenkard, für die praktische Unterstützung und Anleitung bei der Laborarbeit. Ihr unermüdlicher Einsatz hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Mitdoktorandinnen Zsuzsa Jenei- Lanzl und Carola Pfaller für die gegenseitige Unterstützung und nicht zuletzt den Spaß, den wir bei der Zusammenarbeit hatten.

Meinen Eltern und Freunden für die moralische Unterstützung in dieser Zeit.

Diese Dissertation ist meinen Eltern gewidmet.