

AUS DER ABTEILUNG  
FÜR UNFALLCHIRURGIE  
PROF. DR. M. NERLICH  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

# Der Einfluss von $17\beta$ -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Marion Huber

2012

Dekan: Prof. Dr. Thorsten E. Reichert

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Angele

2. Gutachter: Prof. Dr. Thorsten E. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2013

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1	Allgemeine Einleitung . . . . .	4
1.2	Knorpelgewebe . . . . .	5
1.2.1	Molekulare Knorpelzusammensetzung . . . . .	5
1.2.2	Struktur des Gelenkknorpels . . . . .	7
1.3	Gelenkknorpelverletzungen . . . . .	9
1.4	Therapeutische Verfahren bei Knorpelschäden . . . . .	10
1.4.1	Konservative Therapie . . . . .	11
1.4.2	Operative Therapie . . . . .	11
1.4.3	Weitere symptomatische Therapieverfahren . . . . .	14
1.5	Mesenchymale Stammzellen . . . . .	15
1.5.1	Ursprung und Herkunft . . . . .	15
1.5.2	Eigenschaften . . . . .	16
1.5.3	Charakterisierung . . . . .	17
1.6	Chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in vitro . .	17
1.7	Therapeutische Verwendung von mesenchymalen Stammzellen . . . . .	19
1.8	Knorpel als Sexualhormon-sensitives Gewebe . . . . .	21
1.9	Überblick über Estrogen-Wirkungswege . . . . .	22
1.10	Projektbeschreibung und Vorergebnisse . . . . .	26
1.10.1	Etablierung eines in vitro Chondrogenesemodells . . . . .	27
1.10.2	Sexualhormonrezeptoren während der Chondrogenese . . . . .	27
1.10.3	Steroidhormonzugabe in der Proliferationsphase . . . . .	28
1.10.4	Steroidhormonzugabe in der Differenzierungsphase . . . . .	28
1.10.5	Dosis-Wirkungs-Beziehung der Estrogenzugabe . . . . .	29
1.10.6	Beeinflussung der Östrogenwirkung durch ICI 182.780 . . . . .	29
1.10.7	Zusammenfassung der Vorergebnisse . . . . .	29
1.11	Fragestellungen dieser Arbeit . . . . .	30
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>32</b>
2.1	Geräte . . . . .	32
2.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	33
2.3	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	33
2.4	Medien, Medienzusätze und Seren . . . . .	35
2.5	Spezifische Medienzusätze . . . . .	36

2.6	Antikörper und Enzyme . . . . .	37
2.7	Puffer und Lösungen . . . . .	37
2.7.1	Histologie . . . . .	37
2.7.2	Immunhistochemie . . . . .	38
2.7.3	Elisaverdau . . . . .	39
2.7.4	Sonstige Lösungen . . . . .	40
2.8	Test-Kits . . . . .	40
2.9	Zellmaterial . . . . .	41
2.10	Computerprogramme . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>42</b>
3.1	Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen . . . . .	42
3.1.1	Zellgewinnung aus dem Knochenmark . . . . .	42
3.1.2	Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität . . . . .	43
3.1.3	Kryokonservierung von Zellen . . . . .	43
3.1.4	Amplifizierung . . . . .	44
3.2	In vitro Chondrogenesemodell . . . . .	44
3.2.1	Sequenzielle Zugabe von $17\beta$ -Estradiol . . . . .	46
3.2.2	Sequenzielle Zugabe von E2-BSA . . . . .	47
3.2.3	Untersuchung nicht-klassischer Estrogeneffekte über GPR30 . . . . .	48
3.2.4	Blockierung nicht-klassischer Estrogeneffekte über GPR30 . . . . .	49
3.2.5	Dosis-Wirkungs-Beziehung der Estrogenzugabe bei weiblichen MSCs . . . . .	49
3.3	Makroskopie . . . . .	50
3.4	Histologische und immunologische Färbungen . . . . .	50
3.4.1	Gewebevorbereitung für histologische und immunologische Methoden . . . . .	51
3.4.2	Histologische DMMB-Färbung . . . . .	51
3.4.3	Immunhistochemische Kollagen Typ II-Detektion . . . . .	51
3.5	Biochemische Analyseverfahren . . . . .	53
3.5.1	Gewebeaufbereitung für biochemische Analyseverfahren . . . . .	53
3.5.2	DNA-Bestimmung . . . . .	54
3.5.3	GAG-Bestimmung . . . . .	54
3.5.4	Kollagen Typ II-Bestimmung . . . . .	55
3.6	Statistik . . . . .	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
4.1	Wirkung von $17\beta$ -Estradiol . . . . .	58

4.2	Wirkung von E2-BSA . . . . .	61
4.3	Nicht-klassische Estrogenwirkung über GPR30 . . . . .	63
4.4	Blockierung der nicht-klassischen Estrogenwirkung über GPR30 . . . . .	66
4.5	Wirkung von Estrogen bei weiblichen hMSCs . . . . .	69
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
5.1	Estrogensensible Phasen im Verlauf der chondrogenen Differenzierung . .	73
5.2	Membranvermittelte Estrogeneffekte über GPR30 . . . . .	75
5.3	Estrogenwirkung auf die Chondrogenese von MSCs weiblicher Spenderinnen	77
5.4	Ausblick . . . . .	78
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>96</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis . . . . .	96
8.2	Tabellenverzeichnis . . . . .	96
8.3	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	97
8.4	Auswertung der biochemischen Analyse . . . . .	100
<b>9</b>	<b>Erklärungen</b>	<b>102</b>
9.1	Ehrenwörtliche Erklärung . . . . .	102
9.2	Erklärung zur Anregung und Überwachung der Dissertation . . . . .	102
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>103</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>104</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einleitung

Im klinischen Alltag stellt Gelenkschmerz aufgrund von Knorpeldegeneration und Knorpelschädigung ein ernsthaftes Problem dar [1]. Es wird geschätzt, dass bei den über 65-Jährigen mehr als 90 Prozent an einer zum Teil sehr schmerzhaften Osteoarthritis leiden [2]. Aber nicht nur mit dem Alter verliert der Knorpel seine optimalen biomechanischen Eigenschaften, auch immer mehr aktive, junge Leute sind betroffen. Bei ihnen sind hauptsächlich Sportverletzungen und mechanische Überlastung die Ursache für Schäden, die einen Verlust der Struktur und Funktion des Gelenkknorpels verursachen [3]. Nach einer Verletzung besitzt der Knorpel nur eine sehr geringe Fähigkeit zur Heilung bzw. zur Regeneration. Schon kleine Knorpeldefekte führen dann zu Dauerschäden und der Entstehung einer Osteoarthritis, die chronische Schmerzen verursacht und die Lebensqualität stark beeinträchtigt. Bei Knorpelschäden im jungen Alter ist es besonders wichtig, dass möglichst früh geeignete Therapieverfahren angewendet werden, um einer generellen Gelenkerkrankung vorzubeugen und langfristig Schmerzfreiheit und ein hohes Maß an Aktivität zu gewährleisten [4].

Das Ziel jedes therapeutischen Ansatzes zur Behandlung von Verletzungen des Gelenkknorpels ist, die Schmerzen zu lindern, die Gelenkfunktion wiederherzustellen und vor allem die Progression des Schadens zu vermeiden oder zu verzögern [5, 6]. Obwohl sich im klinischen Alltag zur Behandlung symptomatischer Knorpeldefekte mehrere interventionelle Techniken etabliert haben (vgl. Abschnitt 1.4), konnte bisher noch kein Vorgehen identifiziert werden, das einen vollständigen und dauerhaften Erfolg liefert [7].

In der Wissenschaft besteht ein großes Streben nach der Regeneration eines hyalinen Knorpels, der sowohl strukturell als auch funktionell den Anforderungen des nativen Knorpels entspricht. In den letzten Jahren haben sich neue Ansätze aus den Fortschritten in den Bereichen der Regenerativen Medizin und des Tissue Engineerings ergeben. Das Tissue Engineering ist ein rasch wachsender, interdisziplinärer Forschungszweig an der Schnittstelle von Biomedizin, Lebenswissenschaften und Materialforschung. Durch den Einsatz einer Kombination aus Knorpelzellen oder deren Vorläuferzellen, Signalmolekülen und Wachstumsfaktoren, Trägermaterialien (engl. Scaffolds) und externen mechanischen Stimuli soll die regenerative Fähigkeit des Knorpels verbessert und seine gesunde, funktionsfähige Struktur wiederhergestellt werden [5, 8, 9].

Auch aus sozialmedizinischer Sicht hat die Entwicklung einer erfolgreichen Knorpeltherapie einen hohen Stellenwert. Verletzungen des Gelenkknorpels führen durch die steigende

Lebenserwartung in den Industrieländern und die Begünstigung der Entstehung einer Osteoarthritis zu enormen Behandlungs- und Folgekosten.

## 1.2 Knorpelgewebe

Knorpel wird dem Binde- und Stützgewebe zugeordnet. Er ist frei von Blutgefäßen, Lymphbahnen und Nervenfasern [10]. Im humanen adulten Organismus werden drei Arten von Knorpel unterschieden: Faserknorpel, elastischer Knorpel und hyaliner Knorpel. Alle weisen eine jeweils einzigartige molekulare Zusammensetzung und Organisation ihrer extrazellulären Matrix auf [11].

Knorpel stammt von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen ab. Er spielt sowohl bei der Entwicklung der Vertebraten als transientes Gewebe als auch im Erwachsenen als permanente Struktur eine wichtige Rolle. Die meisten Knochen entstehen aus hyalinen Knorpelanlagen. Im Verlauf der embryonalen Skelettentwicklung wird Knorpel nach dem Prinzip der enchondralen Ossifikation durch Knochen ersetzt. In Röhrenknochen besteht ein Teil des Knorpelgewebes zwischen verknöchelter Epiphyse und Diaphyse solange als Wachstumsanlage fort, bis das Längenwachstum beendet ist. Dauerhaft findet man hyalinen Knorpel als stützendes Grundgewebe im Skelett der Nase, der Trachea, der Bronchien und des Kehlkopfes, als Rippenknorpel und an den Knochenendflächen echter Gelenke (sog. Diarthrosen) [5, 11].

Der hyaline Knorpel echter Gelenke ermöglicht durch seinen komplexen Aufbau einen praktisch reibungsfreien Ablauf der Bewegung. Er vereint in einzigartiger Weise die Materialeigenschaften Steifheit, Elastizität und Reibung [12].

### 1.2.1 Molekulare Knorpelzusammensetzung

Knorpelgewebe besteht aus den Knorpelzellen (Chondrozyten) und einer speziellen, extrazellulären Matrix:

#### **Chondrozyten des Gelenkknorpels**

Bei den Chondrozyten des erwachsenen Gelenkknorpels handelt es sich um hoch spezialisierte Zellen, die die Knorpelgrundsubstanz produzieren. Das Zellvolumen beträgt abhängig von der Gelenklokalisierung lediglich 1 – 3 % des Knorpelgesamtvolumens [10, 12]. Je nach Knorpelzone unterscheiden sich die Chondrozyten in ihrer Größe, Form und metabolischen Aktivität. Für eine normale Knorpelfunktion organisieren die Knorpelzellen die synthetisierten Matrixbestandteile zu einem strukturellen Grundgerüst und verändern die Zusammensetzung der Bestandteile je nach Anforderung des Gewebes [13, 14].



Unter physiologischen Bedingungen halten die Knorpelzellen ein stabiles Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau von Bestandteilen der Matrix aufrecht. Der Austausch von Nahrung und Stoffwechselprodukten erfolgt dabei über Diffusion an der Gelenkoberfläche oder dem subchondralen Knochen [15, 16]. Die Widerstandsfähigkeit des Knorpels bleibt bei altersbedingten Strukturveränderungen, die durch eine verminderte Produktion von Proteoglykankomponenten der Matrix und einer Abnahme der Chondrozytenzahl verursacht werden, erhalten [8, 12].

### **Die extrazelluläre Knorpelmatrix**

Die Knorpelzellmatrix besteht aus zwei Komponenten: Der Gewebeflüssigkeit und dem Netzwerk aus großmolekularen Matrixbestandteilen. Die Gewebeflüssigkeit trägt 70 – 80 % zum Gewicht des Knorpels bei und enthält Wasser, Gase, kleine Proteine, Stoffwechselmetabolite und eine hohe Konzentration an Kationen, die die negative Ladung der Glykosaminoglykane ausgleichen. Die Interaktion der Gewebeflüssigkeit mit makromolekularen Bestandteilen der Matrix beeinflusst im Wesentlichen die mechanischen Eigenschaften - Formfestigkeit, Belastbarkeit und Widerstandsfähigkeit - des Knorpelgewebes [10].

Die strukturellen Makrobestandteile sind Kollagen, Proteoglykan und die sog. nicht-kollagenartigen Moleküle und Glykoproteine. Sie tragen 20 – 30 % zum Gewicht des Knorpels bei. Die Zusammensetzung und Anordnung dieser drei Klassen variiert innerhalb der Lokalisation im Gewebe. Die Kollagene haben einen Anteil von bis zu 20 %, Proteoglykane von 5 – 7 % und die nicht-kollagenartigen Proteine sowie Glykoproteine von 3 – 5 % [10, 12].

Die Kollagene sind relativ gleichmäßig im Knorpelgewebe verteilt. Sie verleihen als Netzwerk miteinander verbundener Kollagenfibrillen Form und Zugfestigkeit. Für den hyalinen Gelenkknorpel sind die Kollagene vom Typ II, VI, IX, X, und XI charakteristisch. Kollagen Typ II ist mit einem Anteil von bis zu 95 % das Hauptkollagen des Knorpels und liefert den größten Anteil der Fibrillen des Matrixgerüsts. Kollagen Typ XI ist als stabilisierender Bestandteil an Kollagen Typ II gebunden, wohingegen Kollagen Typ IX der Quervernetzung und der Verankerung des Kollagengerüsts dient. In der unmittelbaren Umgebung der Knorpelzellen, der sog. perizellulären Matrix, findet sich Kollagen Typ VI, welches mit weiteren Matrixbestandteilen interagiert und die Befestigung der Chondrozyten aufrechterhält. Dem Kollagen Typ X, das im Bereich des mineralisierten Knorpels und in der Hypertrophiezone der Wachstumsfugen nachweisbar ist, wird eine Funktion bei der Mineralisation des Knorpels zugeschrieben [5, 10, 17, 18].

Die zweite makromolekulare Hauptkomponente ist die Gruppe der Proteoglykane, be-

stehend aus einem Kernprotein und einer oder mehreren daran gebundenen Ketten aus negativ geladenen Glykosaminoglykanen (GAGs). Diese haben die Fähigkeit, Kationen und Wasser anzuziehen. Typische Glykosaminoglykane des Knorpels sind Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat. Die monomeren Proteoglykane liegen zu einem Anteil von 90 % als Proteoglykanaggregate, den sog. Aggrekanen, vor, wobei viele (bis zu 300) monomere Kernproteine über Verbindungsproteine an Hyaluronsäure gekoppelt werden. Diese Aggregate füllen den größten Anteil des interfibrillären Matrixraumes aus. Kleine Proteoglykane, wie Biglykan, Decorin, Lumican und Fibromodulin, haben dagegen neben kürzeren Proteinketten auch weniger GAG-Ketten und spielen eine Rolle bei der Regulation der Kollagenfibrillenbildung [5, 19].

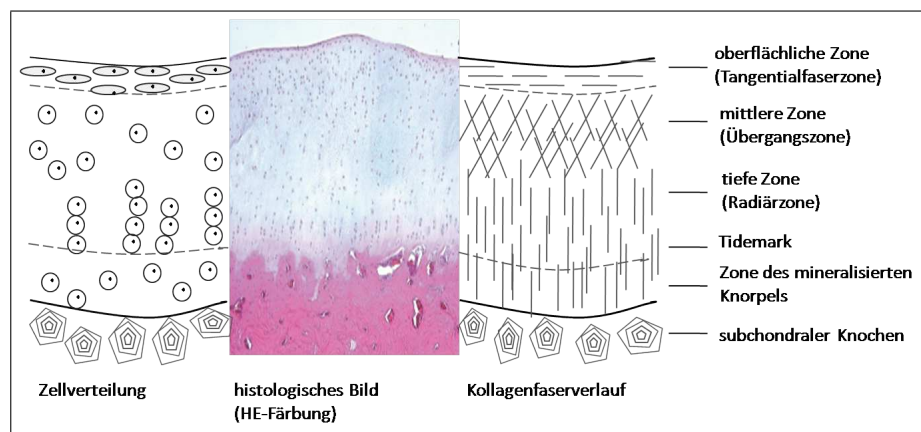
Als letzte Komponente sind eine große Anzahl nicht-kollagenartiger Moleküle und Glykoproteine, wie zum Beispiel Anchorin, Fibronectin und Tenascin, in der extrazellulären Knorpelmatrix anwesend. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig verstanden. Einige von ihnen spielen wohl bei der Organisation der makromolekularen Matrixbestandteile, der Verankerung der Knorpelzellen und der osmotischen Bindung von interstitiellem Gewebewasser eine Rolle [10].

### 1.2.2 Struktur des Gelenkknorpels

Sowohl die Organisation und Zusammensetzung als auch die mechanischen Eigenschaften des Knorpels sind abhängig von der Entfernung des Gewebes zur Gelenkoberfläche. Anhand der morphologischen Veränderung der Chondrozyten und ihrer Matrix ist es möglich, histologisch vier verschiedene, oberflächenparallel verlaufende Zonen zu identifizieren. Der oberflächlichen Zone (Tangentialfaserzone) folgen die mittlere Zone (Übergangszone), die tiefe Zone (Radiärzone) und die Zone des mineralisierten Knorpels (vgl. Abbildung 1) [10].

Die oberflächliche Zone ist die dünnste Zone (10 – 20 % der Knorpeldicke). Eine zellfreie Schicht aus Polysacchariden bedeckt die Gelenkoberfläche, darunter ordnen sich spindelförmige Chondrozyten tangential zur Gelenkoberfläche an. Die Matrix hat einen hohen Gehalt an Kollagen Typ II und Wasser, die Proteoglykan-Konzentration ist dagegen niedrig. Die parallel zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfibrillen reichen bis in die tiefer liegenden Schichten und verleihen dieser Zone so eine außerordentliche Zugfestigkeit.

Die mittlere Zone des Knorpels macht 40 – 60 % seiner Dicke aus. Die Knorpelzellen haben eine kugelige Form und sind in kleinen, isogenen Gruppen, den sog. Chondronen,



**Abbildung 1:** Zonen des hyalinen Knorpels: Oberflächliche Zone (Tangentialfaserzone), mittlere Zone (Übergangszone), tiefe Zone (Radiärzone) und Zone des mineralisierten Knorpels. Die Tidemark befindet sich zwischen der tiefen Zone und der Zone des mineralisierten Knorpels. Unter dem Gelenkknorpel schließt sich subchondraler Knochen an. Dargestellt sind die Zellverteilung und Form der Chondrozyten (links), das histologische HE-Bild (Mitte) und der Kollagenfaserverlauf (rechts) (modifiziert nach [12]).

angeordnet. Sie produzieren eine Matrix, die im Vergleich zur oberflächlichen Zone einen höheren Gehalt an Proteoglykanen, jedoch niedrigere Konzentrationen von Kollagen Typ II und Wasser aufweist. Während sich die durchmesserstärkeren Kollagenfasern im nicht-druckbelasteten Knorpel überwiegend senkrecht anordnen, richten sie sich bei Belastung des Gelenkknorpels zur optimalen Druckverteilung horizontal aus.

Die Chondrozyten der tiefen Zone (30 % der Knorpeldicke) weisen eine kugelförmige Gestalt auf und ordnen sich in Säulen senkrecht zur Gelenkoberfläche an. Hier finden sich die durchmesserstärksten Kollagenfasern, die höchste Konzentration an Proteoglykanen und der niedrigste Wassergehalt. Die überwiegend senkrecht verlaufenden Kollagenfasern gehen in die dünne Tidemark und die Zone des mineralisierten Knorpels über.

Die Tidemark ist eine lichtmikroskopisch basophil erscheinende Region an der Grenze von nicht-mineralisiertem zu mineralisiertem Knorpel. Ihre Bedeutung ist noch nicht vollkommen verstanden.

Die dünne Zone des mineralisierten Knorpels trennt den hyalinen Gelenkknorpel vom subchondralen Knochen. Der Anteil der mineralisierten Zone an der Knorpelgesamthöhe beträgt durchschnittlich 3 – 9 %. Die dort anzutreffenden hypertrophen Chondrozyten haben ein großes Volumen und produzieren Kollagen Typ X. In die extrazelluläre Matrix sind Kalziumkristalle eingelagert [5, 10].

### 1.3 Gelenkknorpelverletzungen

Viele unterschiedliche Faktoren führen zu einem Schaden oder Verlust des Gelenkknorpels: Entzündliche und systemische Gelenkerkrankungen, traumatisch bedingte Defekte, mechanische Überlastung des Gelenks, Knochentumore, chirurgische Eingriffe, altersbedingte degenerative Erkrankungen sowie eine Vielzahl unterschiedlicher genetischer und entwicklungsbedingter Anomalien. Die biologischen Besonderheiten des Gelenkknorpels bedingen wesentlich seine eingeschränkten Regenerationsmechanismen. Dazu zählen sowohl seine relativ geringe Zellzahl als auch seine Avaskularität und die fehlende nervale- und Lymphgefäßversorgung [5, 20].

Ein weiterer Grund für die mangelnde Knorpelregeneration wurde für eine lange Zeit darin gesehen, dass der Gelenkknorpel des Erwachsenen sowohl keine eigenen Vorläuferzellen als auch keinen Zugang zu diesen besitzt [21]. Bei Kindern und Jugendlichen hat die Gelenkoberfläche bei noch offenen Epiphysenfugen einen Anschluss zu der hochregenerativen Zellpopulation der Wachstumsfugen. Diese begünstigt im jungen Alter oft eine spontane Regeneration der Knorpelläsionen [4]. In neueren Studien konnte auch innerhalb des erwachsenen Gelenkknorpels eine Subpopulation von Vorläuferzellen identifiziert werden, der man ein Differenzierungspotential in verschiedene mesenchymale Gewebe zuschreibt [22].

Die Einteilung von Knorpelschäden erfolgt im klinischen Alltag nach der Klassifikation der ICRS (engl. International Cartilage Research Society) [4, 21]. Die Klassifikation ist in Tabelle 1 dargestellt.

In Fällen von kleinen Schäden mit einem minimalen Verlust an Matrixkomponenten (sog. Matrixbruch)(vgl. ICRS Grad 1) sind die Chondrozyten durch Neusynthese von Proteoglykanen in der Lage, die strukturellen Verluste auszugleichen. Bei größeren Defekten mit reinen Knorpelgewebsverlusten (sog. partieller Schichtdefekt)(vgl. ICRS Grad 2/3) ist dieser Reparaturmechanismus überfordert. An den Defekträndern ist das so genannte »Cartilage-flow-Phänomen« zu beobachten, bei dem sich die Ränder abrunden und Knorpelmasse in den Defekt einfließt. Eine vollständige Defektauffüllung ist jedoch in diesen Stadien nicht mehr gewährleistet. Bei gleichzeitiger Eröffnung des subchondralen Knochens (sog. kompletter Schichtdefekt)(vgl. ICRS Grad 4) füllt sich der osteochondrale Defekt mit einem Fibringerinnsel und es kommt zur Einwanderung von mesenchymalen Zellen aus den eröffneten Blutgefäßen. Im Verlauf wird eine narbige Auffüllung mit Faserknorpel beobachtet. Dieses Gewebe ist im Vergleich zum nativen Gelenkknorpel weniger stabil gegenüber Druck-, Zug- und Scherkräften und kann innerhalb weniger Monate degenerieren [20, 23, 24].

ICRS Grad	ICRS Beschreibung
0	keine erkennbaren Defekte (normaler Knorpel)
1a	intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Erweichung (nahezu normaler Knorpel)
1b	zusätzlich oberflächliche Risse / Fissuren
2	Läsion < 50 % Tiefe der Knorpeldicke (abnormaler Knorpel)
3a	Läsion > 50 % Tiefe der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht (schwer abnormaler Knorpel)
3b	Läsion > 50 % Tiefe der Knorpeldicke, bis zur kalzifizierenden Schicht
3c	Läsion > 50 % Tiefe der Knorpeldicke, bis zur subchondralen Platte
3d	Läsion > 50 % Tiefe der Knorpeldicke, mit Blasenbildung
4a/b	vollständige Knorpelläsion mit Durchbruch der subchondralen Platte (stark abnormaler Knorpel)

**Tabelle 1:** Einteilung der Knorpelläsionen nach der ICRS Klassifikation

Jeder unbehandelte Knorpeldefekt stellt eine präarthrotische Deformität dar. Er kann über einen längeren Zeitraum ohne klinische Symptomatik verlaufen [4]. Typische klinische Symptome von Schäden des Gelenkknorpels sind neben Schmerzen eine Einschränkung des Bewegungsumfanges des betroffenen Gelenks und die Bildung von Gelenkergüssen. Der sich durch die Verletzung des Knorpels ansammelnde Detritus kann zusätzlich eine entzündliche Synovialitis initiieren, die zu einer weiteren Destruktion des Knorpels und zur Verstärkung der Symptome beiträgt [23, 24].

## 1.4 Therapeutische Verfahren bei Knorpelschäden

In den letzten Jahrzehnten wurden in der Knorpeltherapie zahlreiche unterschiedliche Verfahren entwickelt, die die Gelenkoberfläche wiederherstellen und die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels fördern sollen.

Da ein isolierter Knorpelschaden nicht immer die Hauptursache der Symptome Gelenkschmerz und Bewegungseinschränkung ist, sollten zusätzlich existierende Erkrankungen des betroffenen Gelenks immer mitbehandelt werden. Dazu gehört zum Beispiel die Korrektur von Fehlbelastungen und Bandinsuffizienzen, die unbehandelt einen stark negativen Effekt auf den Erfolg der Methoden zur Reparatur von Knorpeldefekten haben. Anschließende Rehabilitationsmaßnahmen sollen an die Begebenheiten des behandelten

Knorpeldefekts, die Behandlungsmethode und die individuellen Bedürfnisse angepasst werden [25].

#### 1.4.1 Konservative Therapie

Zu den konservativen Therapiemöglichkeiten zählen die Physikalische Therapie, die Eisapplikation und die Gabe antiphlogistischer Medikamente. Bei der Behandlung von Knorpelschäden im Erwachsenenalter kann mit diesen Maßnahmen eine Reduktion der Symptome erreicht werden. Die strukturelle Verletzung des Knorpels wird damit jedoch nicht behandelt.

Eine konservative Knorpeltherapie wird hauptsächlich bei Kindern und Jugendlichen mit noch offenen Epiphysenfugen und kleineren Knorpelläsionen angewendet. Die gewebespezifischen Zellen der Wachstumsfuge bedingen in dieser Altersstufe oft einen guten Spontanverlauf [4].

#### 1.4.2 Operative Therapie

Liegen beim Erwachsenen Verletzungen des Knorpels vor, ist meist ein operatives Vorgehen zur Wiederherstellung der Gelenkoberfläche und zur Verhinderung einer weiteren Degeneration benachbarter Knorpelflächen erforderlich. Gängige Verfahren sind die Refixation, knochenmarkstimulierende Methoden, die osteochondrale Rekonstruktion, die Perichondrium- und Periostlappenplastik und die Autologe Chondrozyten Transplantation. Durch die Schaffung einer kongruenten Gelenkoberfläche sollen die mechanisch einwirkenden Kräfte wieder gleichmäßig auf den gesamten Knorpel verteilt und eine normale Gelenkfunktion mit freier und schmerzloser Bewegung wiederhergestellt werden [4, 7, 8].

##### **Refixation**

Bei akuten Traumen kann es zur Abscherung von Knorpelteilen (sog. chondralen Flakes) oder zu Ausrissen von Knorpel-Knochen-Stücken (sog. osteo-chondralen Flakes) kommen. Die möglichst zeitnahe Refixation dieser Fragmente stellt bei frischen Knorpelläsionen eine wichtige Behandlungsmethode dar, da der hochspezialisierte hyaline Knorpel erhalten werden kann. Für den Erfolg dieser Methode ist neben der frühen Diagnostik vor allem die Qualität des ausgerissenen Flakes entscheidend. Osteochondrale Fragmente mit einer breiten Knochenfläche und einem intakten Knorpelüberzug, der keine Kontusionsspuren aufweist, eignen sich besonders gut. Die Refixation rein chondraler Flakes wird nur bei Kindern und Jugendlichen durchgeführt, bei Erwachsenen ist die Wahrscheinlichkeit einer stabilen Einheilung im Defekt gering.

Für die Refixation traumatischer Knorpel-Knochen-Abspaltungen wurden lange Zeit metallische Implantate wie Kirschner-Drähte, Klammern und Kleinfragmentschrauben verwendet. In letzter Zeit wird jedoch vermehrt auf biodegradable Osteosynthese-Implantate zurückgegriffen [4, 26].

### **Knochenmarkstimulierende Methoden**

Die so genannte Penetration des subchondralen Knochens ist die erste Methode, die entwickelt wurde, um die Bildung von neuem Gelenkknorpel zu fördern. Sie ist als knochenmarkstimulierende Methode bis heute weit verbreitet und wird entweder mittels Abrasionsarthroplastik, Knochenbohrung (Drilling) oder Mikrofrakturierung bei kleinen, rein knorpeligen Defekten mit einer Größenausdehnung bis  $2\text{ cm}^2$  durchgeführt. Die Eröffnung von Blutgefäßen und dem Knochenmark führt zur Bildung eines Fibringerinnsels über dem präparierten Defektbereich. Einwandernde undifferenzierte, mesenchymale Zellen proliferieren und differenzieren zu Zellen, die morphologisch dem Bild der Knorpelzellen entsprechen.

Die Regeneratqualität weist eine große Variabilität, auch in Abhängigkeit vom Alter des Patienten, auf. Meist wird die Bildung von mechanisch inadäquatem Faserknorpel beobachtet. Das entstandene Ersatzgewebe kann die auf das Gelenk einwirkenden Kräfte nur unzureichend auf die gesamte Gelenkoberfläche verteilen, sodass es eine im Vergleich zu nativen Gelenkknorpel deutlich reduzierte mechanische Belastbarkeit und Dauerhaftigkeit aufweist. Es wird vermutet, dass jüngere Patienten bei gleicher Ausgangslage ein größeres Potential haben, eine funktionsfähige Gelenkoberfläche zu bilden [4, 7, 8, 27].

### **Osteochondrale Rekonstruktion**

Die osteochondrale Transplantation (OCT) ist als so genannte Mosaikplastik eine effektive Methode, fokale Gelenkdefekte mit einer Größenausdehnung bis  $4\text{ cm}^2$  zu reparieren und die Schmerzen der meisten Patienten zu reduzieren. Bei diesem Verfahren werden Knorpel-Knochen-Zylinder aus weniger belasteten Regionen des gleichen Gelenks entnommen und in das beschädigte Areal durch Presspassung eingebracht. Die Transplantate besitzen eine komplett geformte extrazelluläre Matrix mit stoffwechselaktiven Knorpelzellen, die die Matrixbildung aufrechterhalten [7, 8, 27].

Der Vorteil dieser Methode liegt bei richtiger Positionierung der Zylinder in einer guten Oberflächenrekonstruktion der Knorpelschicht bei gleichzeitiger Wiederherstellung des geschädigten Knochens. Durch die begrenzte Anzahl möglicher Entnahmeregionen und deren Beschädigung ist diese Methode jedoch auf mittlere Knorpeldefekte (bis  $4\text{ cm}^2$ ) limitiert [4].

**Perichondrium- und Periostlappenplastik**

Eine weitere Option ist die Verwendung von Perichondrium (sog. Perichondriumlappenplastik) oder Periost (sog. Periostlappenplastik), denen eine chondrogene Potenz zugeschrieben wird. Bei dieser Methode wird entnommene Knorpel- oder Knochenhaut als Gewebelappen über den Defektbereich genäht. Undifferenzierte Perichondrium- bzw. Periostzellen sollen in der neuen Umgebung zu Knorpelzellen differenzieren und im Defektbereich ein funktionsfähiges Regeneratgewebe bilden.

Die Perichondriumlappenplastik zeigt eine im Vergleich zur Periostdeckung schwächere Chondrogenese und eine im Verlauf stärkere Verknöcherung des neu gebildeten Gewebes. Vor allem bei Erwachsenen jüngeren Alters mit posttraumatischen, umschriebenen Knorpelläsionen werden mit dieser Methode klinisch gute Ergebnisse erzielt. Im Alter nimmt jedoch bei verminderter Zellzahl die Fähigkeit der undifferenzierten Zellen ab, eine neue Gelenkoberfläche zu formen [7, 8, 27].

**Autologe Chondrozyten Transplantation**

Die Implantation von körpereigenen Chondrozyten wird seit 1968 erforscht. Die Technik der Autologen Chondrozyten Transplantation (ACT) markiert den Beginn des Tissue Engineerings in der orthopädischen Chirurgie und wurde erstmals 1987 von Peterson und seinen Kollegen in Göteborg durchgeführt [28]. Die ACT wird als erste Generation des Tissue Engineerings bezeichnet [29] und ist die Methode der Wahl für die Behandlung größerer Knorpeldefekte (Größenausdehnung  $> 4 \text{ cm}^2$ ) [4].

Bei der konventionellen ACT werden in einem ersten Eingriff Chondrozyten aus einem wenig belasteten Gelenkbereich entnommen und *in vitro* expandiert. In einem zweiten Eingriff werden diese dann in den mit einem Periostlappen oder einer kollagenen Membran abgedeckten und mit Fibrinkleber versiegelten Defekt injiziert [6, 7]. Der Knorpelschaden füllt sich im weiteren Verlauf bei dem Großteil der Patienten mit hochwertigem Regeneratgewebe, welches eine hyalinähnliche Struktur und gute biomechanische Eigenschaften aufweist. Trotz der guten klinischen Ergebnisse hat die ACT einige bisher ungelöste Probleme: Die Entnahmestelle wird bleibend beschädigt. Bei einigen Patienten beobachtet man ferner eine nur insuffiziente Reparatur mit mechanisch inadäquatem Faserknorpel oder eine Hypertrophie des Periostlappens, welcher den Defekt bedeckt. Zusätzlich besteht die methodische Schwierigkeit, differenzierte Chondrozyten in großem Maße *in vitro* zu expandieren, da dieser Vorgang mit einer Dedifferenzierung dieser Zellen einhergeht [6, 7, 30].

Diese Probleme haben zur Weiterentwicklung des Tissue Engineerings geführt. Die träger-assoziierte ACT (sog. Matrix-ACT) stellt als zweite Generation des Tissue Engineerings



den Einsatz verschiedener biokompatibler Trägermaterialien in den Mittelpunkt. Eine Matrix von präformierter Gestalt wird bei dieser Methode mit den vorexpanidierten Chondrozyten beladen und in den Knorpeldefekt implantiert. Der Träger bietet mechanische Stabilität, unterstützt die Ansiedlung von transplantierten und körpereigenen Zellen, stimuliert die Matrixbildung und hält als dreidimensionales Konstrukt den differenzierten Phänotyp der Chondrozyten aufrecht [6, 7, 25, 29, 31]. Die Matrix-ACT eignet sich besonders für die Behandlung von Knorpelschäden mit einer Größenausdehnung  $> 4 \text{ cm}^2$ . Auch Defekte mit einem größeren knöchernen Anteil können mit dieser Methode gut behandelt werden [4].

Die dritte Generation des Tissue Engineerings befindet sich im experimentellen Stadium. Hierbei soll die in vivo Regeneration einer Knorpelläsion durch den Einsatz von Trägermaterialien und Signalmolekülen erreicht werden. Die Signalmoleküle sollen eine spezifische Zellmigration aus dem umgebenden intakten Gewebe initiieren, deren Ansiedlung in die implantierte Matrix begünstigen und die Zellen zu Proliferation und Differenzierung stimulieren [6, 7, 25].

### 1.4.3 Weitere symptomatische Therapieverfahren

Bei größeren und multilokalen Knorpelverletzungen haben die genannten operativen Verfahren zur Knorpelwiederherstellung und Knorpelregeneration (vgl. Abschnitt 1.4.2) nur einen geringen Erfolg und liefern häufig kein dauerhaftes Ergebnis. Diesen Patienten können dann weitere operative Techniken wie die Gelenkspülung mit Knorpelglättung oder die Osteotomie angeboten werden. Diese Verfahren tragen zu einer symptomatischen Verbesserung der Beschwerden bei, bewirken aber keine Regeneration des Knorpeldefekts. Auch die Entwicklung von Dauerschäden wird nicht gebremst. Als definitive Behandlung folgt häufig der operative Gelenkersatz, der die schmerzfreie Funktionsfähigkeit des Gelenkes wiederhergestellt. Aufgrund der eingeschränkten Lebensdauer von Endoprothesen ist diese Behandlung bei jungen Erwachsenen jedoch nicht als Primärtherapie zu empfehlen [7, 32].

#### Gelenkspülung mit Knorpelglättung

Die Gelenkspülung mit Knorpelglättung (sog. »Lavage mit Shaving«) bietet als arthroskopisches Verfahren die Möglichkeit, mechanische und entzündliche Ursachen von Gelenkbeschwerden zu behandeln. Durch die Lavage wird das Gelenk von Detritus und Entzündungsmediatoren befreit. Beim Shaving werden abgescherte Knorpelbestandteile entfernt und die Gelenkoberfläche geglättet. Neben der Glättung der Gelenkoberfläche

können zusätzlich Eingriffe an weiteren Strukturen des Gelenks durchgeführt werden. Bei einem Großteil der Patienten führt dieses Verfahren zu einer mittelfristigen Symptomverbesserung und zögert den Zeitpunkt des endoprothetischen Gelenkersatzes hinaus [27, 33].

### **Osteotomie**

Die Osteotomie ist eine Methode, die solche Regionen des Gelenkknorpels miteinander in Kontakt bringt, die noch einen intakten Knorpelüberzug aufweisen. Beschädigte Knorpelregionen werden dadurch entlastet. Dieses Verfahren hat dann einen guten Erfolg, wenn eine unphysiologische Tragachse zumindest eine Mitursache des Knorpeldefekts darstellt. Die Osteotomie wird hauptsächlich bei jungen Patienten angewendet, bei denen der endoprothetische Gelenkersatz noch nicht in Frage kommt [33].

## **1.5 Mesenchymale Stammzellen**

### **1.5.1 Ursprung und Herkunft**

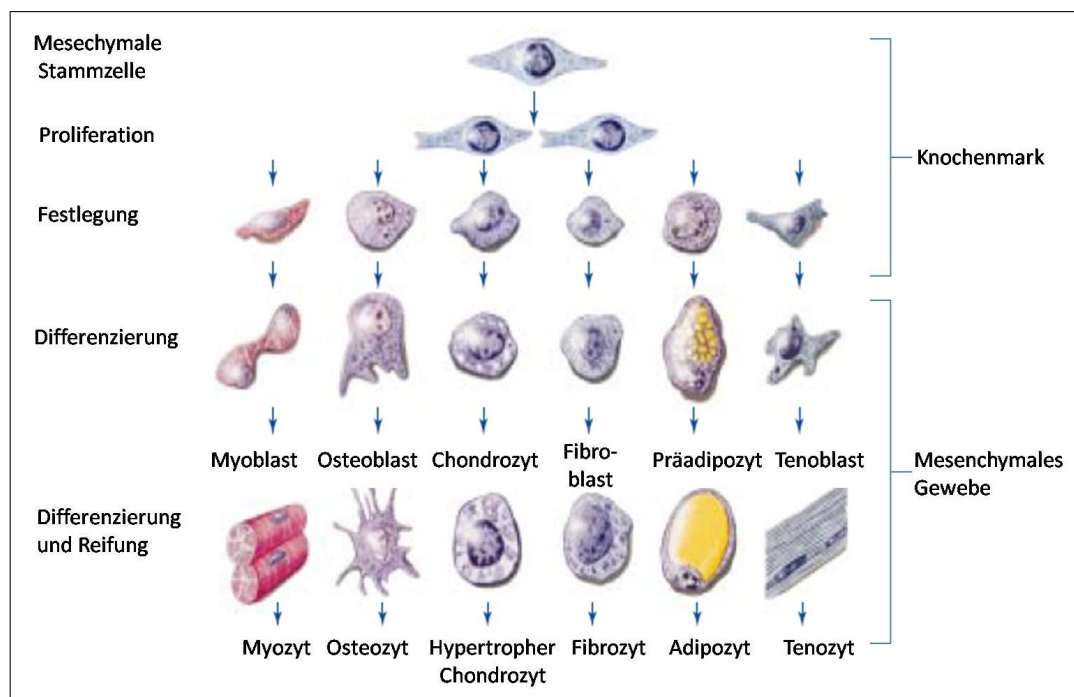
Die Existenz von Stammzellen für nicht-hämatopoetische Zellen im Knochenmark wurde bereits vor über 140 Jahren durch Untersuchungen des deutschen Pathologen Cohnheim angedeutet [34]. Er studierte die Wundheilung verletzter Tiere mittels der venösen Injektion des unlöslichen Farbstoffes Anilin und beobachtete am Wundherd neben entzündungsassoziierten Zellen auch Zellen mit fibroblastischer Morphologie, deren Ursprung er in der Blutbahn und folglich im Knochenmark vermutete [35].

Die grundlegende Pionierarbeit von Friedenstein und seinen Kollegen (1974) zeigte, dass es innerhalb der bindegewebigen Struktur des Knochenmarks eine Subpopulation von adhärent wachsenden, nicht blutbildenden Zellen gibt, die die Fähigkeit besitzen, sich in Knochen, Knorpel und Fett zu differenzieren [36–38]. Diese wurden von Caplan (1991) mit dem Begriff der mesenchymalen Stammzellen (MSCs) bezeichnet [39]. Sie machen nur einen sehr kleinen Anteil (etwa 0,001–0,01 %) an der Gesamtpopulation kernhaltiger Knochenmarkzellen aus, wobei ihre Anzahl mit dem Lebensalter zunehmend abnimmt. So ist bei jungen Erwachsenen etwa noch eine von 10.000 Zellen, bei älteren Menschen nur noch eine von zwei Millionen Zellen eine mesenchymale Stammzelle [38, 40].

In verschiedenen Studien konnten mesenchymale Stammzellen neben dem Knochenmark auch aus weiteren humanen Geweben isoliert werden, nämlich aus Periost [41, 42], trabekulärem Knochen [32, 43], Fettgewebe [44–46], Synovia [47], Skelettmuskel [48], Lunge [49], Milchzahn [50] und der Wharton Sulze der Nabelschnur [51]. Das Knochenmark stellt wegen seiner Ergiebigkeit jedoch weiterhin die Hauptquelle zur experimentellen Gewinnung von MSCs dar.

### 1.5.2 Eigenschaften

Mesenchymale Stammzellen sind elementare Bestandteile des Knochenmarks. Sie dienen nicht nur als mesenchymale Vorläuferzellen, sondern erfüllen auch eine wichtige Funktion bei der Unterstützung der Hämatopoese [52, 53]. MSCs zeichnen sich durch zwei entscheidende Charakteristika aus. Zum einen besitzen sie ein hohes Selbsterneuerungspotential und lassen sich *in vitro* in großem Maße (mehr als 50 Zellverdopplungen) expandieren. Dies erfolgt unter der Ausbildung von Kolonien aus spindelförmigen Zellen, den so genannten CFU-F (engl. colony forming unit-fibroblasts) [52]. Zum anderen besitzen MSCs die Fähigkeit, sich in verschiedene Zelltypen des mesenchymalen Bindegewebes zu differenzieren (vgl. Abbildung 2) [40]. Es wurde bisher die Differenzierung in Knochen [54, 55], Knorpel [56], Sehne [57, 58], Skelettmuskel [59, 60], Fettgewebe [35, 61] und die Bildung des hämatopoetischen Stromas [35] beschrieben.



**Abbildung 2:** Das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen. MSCs können sich entlang der mesenchymalen Linie in die Gewebe Muskel, Knochen, Knorpel, Bindegewebe, Fett und Sehne differenzieren (modifiziert nach [29]).

Nach neueren Erkenntnissen ist ferner anzunehmen, dass die mesenchymalen Stammzellen nicht nur als Ersatzzellen für Strukturen des Bewegungsapparates und Bindegewebes

dienen, sondern auch in Zellen nicht-mesenchymalen Ursprungs differenzieren können (sog. Transdifferenzierung) [62]. Es wurde eine Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten, Endothelzellen und Perizyten [63] sowie zu Leberzellen [64, 65] und Zellen neuronalen Charakters [66, 67] beobachtet. Etliche experimentelle Arbeiten weisen darauf hin, dass die mesenchymalen Stammzellen in Bezug sowohl auf ihr Selbsterneuerungspotential als auch auf ihre Fähigkeit, sich entlang verschiedener mesenchymaler Zelllinien zu differenzieren, eine sehr heterogene Gruppe darstellen [44, 68, 69]. So enthält der MSC-Pool des Knochenmarks neben multipotenten Zellen auch Zellpopulationen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien, die dann nur noch ein eingeschränktes (tripotentes, bipotentes oder unipotentes) Differenzierungspotential aufweisen [70]. Nur einem Drittel der aus dem Knochenmark isolierten MSCs wird ein tripotentes Entwicklungspotenzial zur Generierung von Knochen, Knorpel und Fett zugeschrieben [40].

### 1.5.3 Charakterisierung

In der Literatur ist die Charakterisierung der MSCs hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle und Zytokinsekretion sehr heterogen. Es konnte bisher kein Marker identifiziert werden, der eine mesenchymale Stammzelle als Zelltyp eindeutig definiert.

Für die Charakterisierung und Isolierung mesenchymaler Stammzellen werden daher das Vorhandensein bzw. Fehlen verschiedener Oberflächenproteine herangezogen. Zu den positiven Markern werden die Proteine Stro-1, CD73 (Ekto-5'-Nukleotidase), CD106 (VCAM-1), CD90 (Thy-1), CD105 (Endoglin) und CD54 (ICAM-1) gerechnet. Typische hämatopoetische Erkennungsmerkmale, wie der hämatopoetische Stammzellmarker CD34, Marker der myeloiden Differenzierung (CD11b/14), Marker der lymphoiden Differenzierung (CD19/79), das Leukozytenantigen CD45 und das Protein HLA-DR, werden von MSCs dagegen nicht exprimiert [53, 71].

Zu den von MSCs sezernierten Zytokinen zählen die Interleukine -6 (IL-6) und -11 (IL-11), der G-CSF (eng. granulocyte-colony stimulating factor), der M-CSF (engl. macrophage-colony stimulating factor), der LIF (engl. leukemia inhibitory factor) und der SCF (engl. stem cell factor) [72].

## 1.6 Chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in vitro

Die Entwicklung von Knorpel (Chondrogenese) aus MSCs ist das Ergebnis eines komplizierten Zusammenspiels zwischen extrazellulären Signalmolekülen, Matrixbestandteilen,

angebotenen Nährstoffen, dem Sauerstoffpartialdruck, der Zelldichte und mechanisch einwirkenden Kräften [40]. Die multipotenten MSCs entwickeln sich unter diesen Bedingungen schrittweise über Chondroprogenitorzellen und Chondroblasten zu Chondrozyten, die die typische extrazelluläre Knorpelmatrix produzieren. Der Transkriptionsfaktor SOX9 wird in allen Chondroprogenitorzellen und reifen Chondrozyten exprimiert und spielt bei der Regulierung der chondrogenen Differenzierung von MSCs eine wichtige Rolle. SOX9 steuert die Kondensation der Stammzellen, ihre Proliferation und Weiterentwicklung zu Knorpel und ist für die Expression knorpelspezifischer Moleküle wie Kollagen Typ II und Proteoglykan verantwortlich [6].

### **Allgemeine Kulturbedingungen**

Die chondrogene Differenzierung von MSCs erfolgt experimentell in einem dreidimensionalen Kultursystem durch die Inkubation in serumfreiem Kulturmedium und die Zugabe von die Chondrogenese induzierenden Faktoren [73]. Das dreidimensionale Kultursystem ahmt den Prozess der embryonalen mesenchymalen Zellkondensation nach, bei dem spezifische Zell-Zell-Kontakte als Auslöser der chondrogenen Differenzierung gelten [74]. Die Verwendung eines serumfreien Differenzierungsmediums ist wichtig, um unvorhersehbare Effekte auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der MSCs auszuschließen. Serum ist in seiner Zusammensetzung nur schwer zu definieren und kann unbekannte Wachstumsfaktoren oder Hormone enthalten, die die chondrogene Differenzierung unkontrolliert beeinflussen [75].

Es existiert eine Fülle von Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen, welche die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Knorpel reguliert. Als positive Regulatoren der Chondrogenese gelten die Faktoren TGF (engl. Transforming growth factor)  $-\beta 1$ ,  $-\beta 2$  und  $-\beta 3$  [76], BMP (engl. Bone morphogenic protein) -2 und -9 [77], IGF (engl. Insulin-like growth factor) -1 [10, 78] und das Glukokortikoid Dexamethason [79]. Es besteht ein großes wissenschaftliches Interesse, weitere Signalmoleküle mit den dazugehörigen Wirkungswegen zu identifizieren, welche die Chondrogenese beeinflussen [5].

### **Das chondrogene Differenzierungsmodell nach Johnstone (1998)**

Die in dieser Arbeit verwendete Zusammensetzung des chondrogenen Mediums geht auf das von Johnstone und seinen Kollegen (1998) entwickelte Modell der chondrogenen Differenzierung von MSCs zurück. Diese Zusammensetzung wurde seither von vielen weiteren Arbeitsgruppen verwendet und eine gute chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen damit erzielt. Das Basismedium ist DMEM (Dulbeccos-modifiziertes Eagle-Medium) mit einem hohen Glukosegehalt (4,5 g/Liter). Es enthält neben den chondrogen wirkenden Faktoren TGF- $\beta 1$  und Dexamethason die Faktoren IST+3, Ascorbin-

säure und Pyruvat, die wichtige Stoffwechselelemente für eine erfolgreiche Chondrogenese darstellen [80, 81]. Im Folgenden wird die Funktion der wichtigsten Medienzusätze kurz erläutert.

TGF- $\beta$ 1 gilt als starker Promotor der Chondrogenese und bewirkt eine Akkumulation von strukturellen Bestandteilen der extrazellulären Knorpelmatrix [76]. Die chondrogene Wirkung von Dexamethason beruht zum einen auf der Förderung der spontanen Differenzierung der MSCs, zum anderen auf der Stimulierung des Transkriptionsfaktors SOX9, der die knorpelspezifische Genexpression aktiviert [79, 82, 83]. IST+3 enthält in BSA (bovines Serumalbumin) aufgelöstes Insulin, Transferrin, Selensäure und Linolsäure. Der Zusatz von Insulin ist für den Zucker- und Fettstoffwechsel der Zellen wichtig. Transferrin bindet Eisen und stellt als Eisenquelle einen lebenswichtigen Bestandteil für das Zellwachstum von in vitro Kulturen dar. Selensäure sorgt als Co-Faktor der Glutathion-Peroxidase für die Integrität der Zellmembran und Linolsäure ist als Fettsäure in die Zellmembran wachsender Zellen einbaubar. IST+3 als Ganzes führt in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 sogar zu einer additiven Stimulation der Chondrogenese [80, 81]. Ascorbinsäure fungiert als Elektronendonator und beeinflusst als Co-Faktor der Hydroxilierung des Kollagens die Kollagenbildung positiv [84–86].

## 1.7 Therapeutische Verwendung von mesenchymalen Stammzellen

Im Rahmen therapeutischer Konzepte lassen sich drei Felder der zellulären Therapie mit mesenchymalen Stammzellen abgrenzen: Die Geweberegeneration, die Gentherapie und die Immunmodulation bei hämatopoetischer Stammzelltransplantation.

Auf dem Gebiet der Geweberegeneration ist die Anwendung von MSCs zum Wiederaufbau von Knochen und Knorpel am weitesten fortgeschritten. Viele Menschen leiden an Gelenkschmerzen, die oft zu einer Einschränkung der Bewegungsfähigkeit führen. Eine langfristige Entwicklung von hyalinem Knorpel, der sowohl strukturell als auch funktionell den Anforderungen des nativen Knorpels entspricht, konnte bisher mit keinem der vielzähligen therapeutischen Verfahren (vgl. Abschnitt 1.4) erreicht werden [5, 87]. Die Möglichkeit der Reparatur von Gelenkknorpeldefekten mit Hilfe von MSCs ist von großem wissenschaftlichen Interesse. Erste klinische Anwendungen fanden MSCs bereits in Form der autologen MSC-Transplantation bei der Behandlung der Osteoarthritis des Knies [88] sowie zur Therapie osteochondraler Knorpeldefekte der Patella [89] und des Patellofemoral-Gelenks [90]. In einem weiteren Verfahren wurden osteochondrale Knorpelschäden mit MSCs, die in ein Kollagengel eingebettet und im Defektbereich mit einem

Periostlappen fixiert wurden, behandelt [91].

Die Verwendung von MSCs für die Behandlung von Knorpeldefekten bietet gegenüber dem Verfahren der ACT, welches mit Chondrozyten arbeitet, einige Vorteile: Die Gewinnung der MSCs aus dem Knochenmark ist weniger invasiv als die arthroskopische Chondrozytenentnahme vor einer ACT, die zudem zu einer bleibenden Beschädigung der Entnahmeregion führt. Außerdem lassen sich die gewonnenen MSCs in großem Maße in vitro vermehren, ohne dass dabei ihre Fähigkeit verloren geht, sich chondrogen zu differenzieren [90].

Weitere Bestrebungen und experimentelle Studien im Bereich der Geweberegeneration zielen auf die Wiederherstellung von beschädigtem kardialen Gewebe, Lungen- und Lebergewebe und dem ZNS ab [62, 92].

Viele genetische Erkrankungen haben ihre Ursache in der Unfähigkeit von Geweben, bestimmte Sekretionsmoleküle zu bilden, oder in der Sekretion eines defekten Proteins. Weder autologe noch allogene MSCs rufen nach lokaler Transplantation oder systemischer Verabreichung eine Immunreaktion im Empfänger hervor. Dies macht MSCs zu einem idealen Träger, Gene im Rahmen der Anwendungsmöglichkeiten der Gentherapie zu übertragen [73]. Die vom Patienten oder einem geeigneten Spender gewonnenen MSCs werden dabei durch gentechnische Methoden mit der gesunden Kopie des defekten Gens transduziert und anschließend lokal oder systemisch appliziert. Die MSCs sollen dann therapeutisch das fehlende oder defekte Protein bilden und sezernieren [30, 35].

Erste Erfolge werden mit dieser Methode bei der Behandlung der Osteogenesis imperfecta verzeichnet. Die Osteogenesis imperfecta ist eine genetische Erkrankung, bei der es aufgrund des fehlerhaft gebildeten Proteins Kollagen Typ I zu multiplen Frakturen, schweren Skelettdeformierungen und zu einem verminderten Knochenwachstum kommt. In einer klinischen Studie an Kindern, die unter einem schweren Verlauf dieser Erkrankung leiden, wurden nach einer allogenen MSC-Transplantation eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit, eine Steigerung der Knochenmineralisation und ein Rückgang der Frakturhäufigkeit beobachtet [93].

Eine weitere Eigenschaft der MSCs ist ihre immunmodulatorische Funktion. Sie unterdrücken die klonale Expansion und die Aktivität zytotoxischer T-Zellen. Dieser immunsuppressive Effekt spielt vor allem im Bereich der allogenen Knochenmarktransplantation eine wichtige Rolle. Erste klinische Anwendung fanden die MSCs in der Therapie der akuten Abstoßungsreaktion nach allogener Stammzelltransplantation, die dadurch abgeschwächt oder verhindert werden konnte. Weiter sind MSCs bei der Beschleunigung der hämatologischen Erholung nach myeloablativer Behandlung im Einsatz [92, 94, 95].

## 1.8 Knorpel als Sexualhormon-sensitives Gewebe

Zu den Sexualhormonen werden die Estrogene, Gestagene und Androgene gezählt. Sie regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und dem Wachstum nicht nur des Reproduktionstrakts, sondern auch des Skelettsapparats, des zentralen Nervensystems, des kardiovaskulären Systems, des Immunsystems und des Gastrointestinaltrakts [96]. Sexualhormone beeinflussen auch die Entstehung pathologischer Prozesse bei hormonsensitiven Erkrankungen. So wirken zum Beispiel die Estrogene bei der Entstehung des Brust- und Endometriumkarzinoms oder der Osteoporose mit [97, 98].

Es existieren verschiedene Aspekte, die den Knorpel als ein Sexualhormon-sensitives Gewebe ausweisen. Diese dienen als Grundlage für die Annahme in dieser Arbeit, dass die chondrogene Differenzierung humaner MSCs durch Sexualhormone allgemein und durch  $17\beta$ -Estradiol im Speziellen beeinflusst werden kann.

Humaner Gelenkknorpel weist als Sexualhormon-sensitives Gewebe die beiden klassischen Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  ( $ER\alpha$  und  $ER\beta$ ), den nicht-steroidalen Estrogenrezeptor GPR30, die beiden Progesteronrezeptoren A und B (PRA und PRB) und den Androgenrezeptor (AR) auf [96, 99–103]. Auch während der *in vitro* Chondrogenese von MSCs wurden die  $ER\alpha$  und  $ER\beta$ , der Membranrezeptor GPR30 und der AR nachgewiesen [104] (vgl. Abschnitt 1.10.2). Das Vorhandensein dieser Rezeptoren spricht dafür, dass Sexualhormone bei der chondrogenen Differenzierung von MSCs eine Rolle spielen und den Knorpelstoffwechsel beeinflussen.

Das Wachstum der langen Röhrenknochen erfolgt im Bereich der Wachstumsfugen durch den Prozess der enchondralen Ossifikation. Das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung wird hierbei durch eine Vielzahl verschiedener Wachstumsfaktoren und Hormone, einschließlich der Sexualhormone, reguliert. Die Estrogene spielen in der Pubertät beider Geschlechter vor allem beim Längenwachstum und dem Schließen der Wachstumsfugen eine wichtige Rolle [105–108].  $17\beta$ -Estradiol wirkt zum einen direkt auf die Chondrozyten und reguliert deren Proliferation, Differenzierung und die Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Zum anderen erfolgt die Wirkung indirekt, da die Knorpelzellen als Antwort auf die Rezeptorbindung von Estrogen weitere Hormone und Wachstumsfaktoren sezernieren [109, 110].

Die Osteoarthritis ist eine Erkrankung, die durch Degeneration des Gelenkknorpels unter Mitbeteiligung des subchondralen Knochens und der umgebenden Gelenkkapsel gekennzeichnet ist. Die hormonellen Veränderungen im Verlauf der Menopause werden in epidemiologischen Studien als Einflussfaktor auf die Pathogenese der Osteoarthritis an-



gesehen: Die Prävalenz und Inzidenz der Osteoarthritis aller Gelenke ist streng mit dem Alter korreliert. Vor dem Alter von 50 Jahren haben Männer eine höhere Prävalenz und Inzidenz dieser Erkrankung. Ab dem Alter von 50 Jahren jedoch tritt die Osteoarthritis häufiger bei Frauen auf. Frauen erkranken zum einen insgesamt mit einer höheren Prävalenz und Inzidenz an dieser Erkrankung, zum anderen leiden sie häufiger an einer generalisierteren Form und einem schwereren Verlauf [111–113]. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede der Prävalenz und Inzidenz der Osteoarthritis werden mit dem postmenopausalen Estrogenmangel, perimenopausalen Hormonschwankungen und einer veränderten Konzentration an freiem  $17\beta$ -Estradiol in Verbindung gebracht [112, 114]. Die Hypothese des postmenopausalen Estrogenmangels wurde in einer klinischen Studie bestätigt, in der sich ein positiver Zusammenhang zwischen einem niedrigen basalen Serumspiegel an  $17\beta$ -Estradiol und der Entwicklung einer Osteoarthritis des Knies ergab [115]. Andererseits gibt es auch Hinweise dafür, dass gerade  $17\beta$ -Estradiol als ein ätiologischer Faktor der Osteoarthritis und auch der rheumatoiden Arthritis, einer entzündlichen Gelenkerkrankung, anzusehen ist. So wurden bei Patienten mit Osteoarthritis oder rheumatoider Arthritis höhere synoviale Konzentrationen an freiem  $17\beta$ -Estradiol und eine Zunahme der Anzahl an ER im Vergleich zu gesunden Menschen gleichen Alters gefunden [116, 117].

## 1.9 Überblick über Estrogen-Wirkungswege

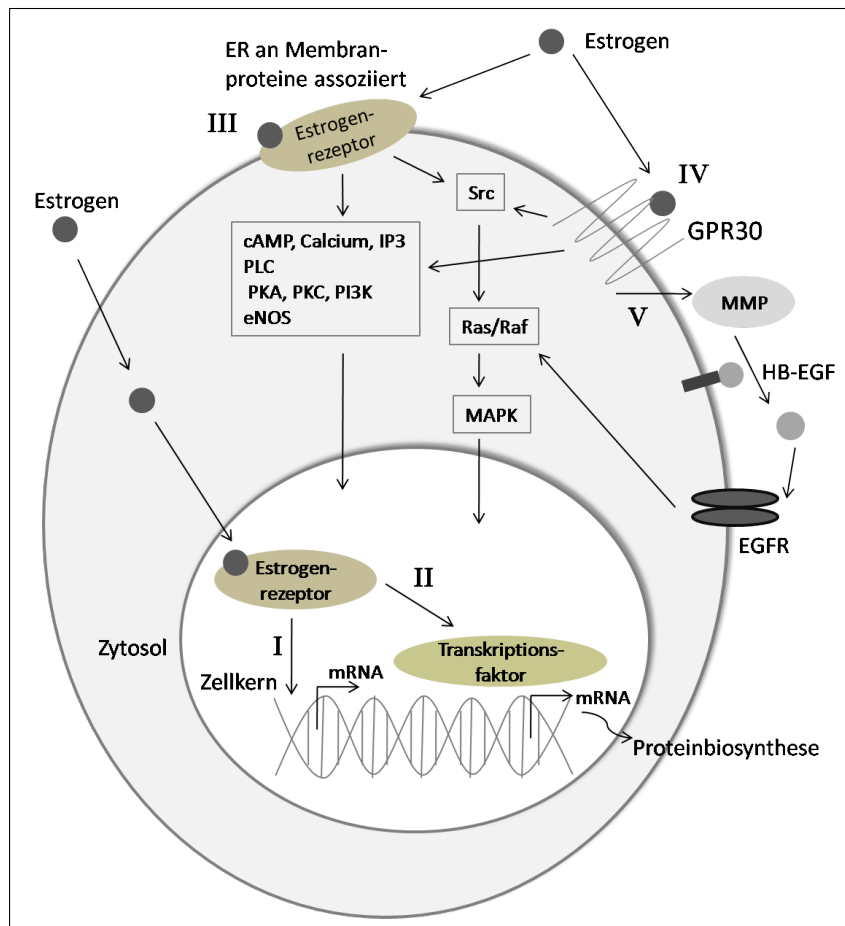
Estrogen, in der aktiven Form das  $17\beta$ -Estradiol (E2), ist ein Mitglied der Familie der Steroidhormone, zu der neben den Sexualhormonen auch die Glukokortikoide und Mineralkortikoide gehören [118].

Estrogene können über verschiedene Mechanismen (vgl. Abbildung 3) die Zellfunktion estrogensensitiver Gewebe beeinflussen. Man unterscheidet die Wirkung des klassischen Signalweges von der des nicht-klassischen Signalweges. Die Interaktion zwischen den beiden Signalwegen führt zu einem zum Teil noch wenig bekannten Netzwerk der Transkriptionsaktivierung und -hemmung estrogensensitiver Gene. Die zunehmende Komplexität der Estrogenwirkung legt nahe, dass die getrennte Betrachtung des klassischen und nicht-klassischen Weges nicht mehr zeitgemäß ist. Beide Signalwege sind untrennbar miteinander verbunden und beeinflussen sich gegenseitig [119]. Zur Vereinfachung erfolgt im Folgenden jedoch eine getrennte Darstellung der beiden Signalwege.

### Klassische estrogenvermittelte Signalwege

Die Wirkung der Estrogene über den klassischen Signalweg (vgl. Abbildung 3 (I) und

(II)) wird durch die Bindung an spezifische Rezeptoren, die Estrogenrezeptoren  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und  $\beta$  (ER $\beta$ ), vermittelt. Die Estrogenrezeptoren gehören der Superfamilie der Steroidrezeptoren an, wozu auch die Rezeptoren für Progesteron, Androgene, Glukokortikoide und Mineralokortikoide zählen. Die codierende DNA der ER ist auf Chromosom 6 (ER $\alpha$ ) und Chromosom 14 (ER $\beta$ ) lokalisiert [97].



**Abbildung 3:** Überblick über Estrogen-Wirkungswege. Der klassische Weg (I und II) beruht auf der Interaktion von E2 mit seinem intrazellulären Rezeptor (ER $\alpha$  oder ER $\beta$ ). Ist der Ligand-Rezeptor-Komplex aktiviert, kann dieser im Zellkern die Transkription der Gene direkt (I) oder indirekt (II) beeinflussen. Die nicht-klassischen Signalwege (III und IV) werden durch die Interaktion von E2 mit an Membranproteinen assoziierten Estrogenrezeptoren (III) oder mit nichtsteroidalen Rezeptoren, wie dem GPR30 (IV), ermöglicht. Beide nicht-klassische Signalwege aktivieren eine Vielzahl von Kinasen, die die Transkription verschiedener Gene regulieren. V beschreibt die Transaktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors EGFR durch GPR30 (modifiziert nach [119–121]).

Der Estrogenrezeptor ist ein intrazellulärer, ligandenaktivierbarer Transkriptionsfaktor. Veränderungen der Gentranskription treten innerhalb von Stunden bis Tagen auf [122]. Bei Abwesenheit hormoneller Stimuli liegt der ER assoziiert an Begleitproteine (HSP90, p23 und Immunophilin) vor [123, 124] und unterliegt einem kontinuierlichen Transport zwischen Zellkern und Zytosol [125]. Diffundiert ein Ligand in die Zelle und bindet am ER, kommt es zur Dissoziation des Multiproteinkomplexes und zur Auslösung von Phosphorylierungsprozessen, die zu einer Konformationsänderung des gesamten ER-Moleküls führen. Dadurch wird die Bildung von Homodimeren ( $ER\alpha/ER\alpha$  bzw.  $ER\beta/ER\beta$ ) oder Heterodimeren ( $ER\alpha/ER\beta$ ) ausgelöst und der Ligand-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern [123].

Beim direkten Weg (vgl. Abbildung 3 (I)) binden die ER-Dimere als Transkriptionsfaktoren an den Promotorbereich korrespondierender, palindromischer DNA-Sequenzen, den so genannten »Estrogen Responsive Elements« (EREs). Infolge der Wechselwirkung zwischen dem Ligand-Rezeptor-Komplex und den EREs kommt es zur Rekrutierung von Co-Aktivatoren und Transkriptionsfaktoren sowie zur Assoziation der RNA-Polymerase II (Initiationskomplex). Aus diesem Initiationskomplex heraus beginnt die RNA-Polymerase II mit der mRNA-Synthese. Dies führt zu einer veränderten Expression der von den estrogensensiblen Genen kodierten Proteine [96, 97, 119, 120].

Der indirekte Weg der klassischen Estrogenwirkung (vgl. Abbildung 3 (II)) stellt einen alternativen Mechanismus zum direkten Weg dar. Die ER-Dimere interagieren hierbei mit Transkriptionsfaktoren, die bereits an den Promotorbereich bestimmter DNA-Sequenzen gebunden sind. Durch die Interaktion des Ligand-Rezeptor-Komplexes mit dem Transkriptionsfaktor wird die Transkription des jeweiligen Gens beeinflusst. Es resultiert eine entweder gesteigerte oder verringerte mRNA- und anschließende Proteinbiosynthese [96, 97, 119, 120, 126].

### **Nicht-klassische estrogenvermittelte Signalwege**

Neben der klassischen Transaktivierung verschiedener Gene durch Estrogen sind Effekte bekannt, die innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Estrogenexposition auftreten [127]. Diese Signale werden von Rezeptoren des nicht-klassischen Signalweges (vgl. Abbildung 3 (III) und (IV)) vermittelt.

Ein kleiner Anteil (ca. 2%) der klassischen Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  ist an der Zellmembran lokalisiert [96]. Estrogene interagieren über den nicht-klassischen Signalweg einerseits mit diesen plasmamembranständigen, an Membranproteine assoziierten ERs (vgl. Abbildung 3 (III)) [120, 126, 127] oder andererseits mit ER-unabhängigen, nicht-steroidalen Membranproteinen, wie dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPR) 30 (vgl.

Abbildung 3 (IV)) [118, 120, 122, 127–129]. Die Aktivierung dieser membranen Estrogenrezeptoren führt über assoziierte Tyrosinkinasen zur Bildung bestimmter intrazellulärer Signale und zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden [126, 127]. Neben der Mobilisierung von intrazellulärem Calcium, der Produktion der sekundären Botenstoffe cAMP und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und der Aktivierung der Phospholipase C (PLC), werden eine Vielzahl von intrazellulären Kinasen, wie die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase C (PKC), die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) sowie der Src-Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalweg, und die endotheliale NO Synthase (eNOS) stimuliert [97, 119, 126–129]. Unter den verschiedenen MAP (engl. Mitogen-activated protein) -Kinasen spielt bei der Estrogenwirkung die Aktivierung von Erk1/2 eine besondere Rolle [129, 130]. Die intrazellulären Signalwege sind untereinander verknüpft und führen im Nukleus zur Phosphorylierung der klassischen ERs, der Co-Faktoren und des Transkriptionskomplexes. Daraus resultiert eine veränderte Transkriptionsaktivität. Durch den nicht-klassischen Signalweg werden somit sowohl schnelle transkriptionsunabhängige als auch verzögerte transkriptionsabhängige Estrogeneffekte vermittelt [126, 128].

### **Estrogenwirkung über GPR30**

GPR30 ist ein G-Protein gekoppelter Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor [122, 131], der hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert wird [132–134]. Er wurde erstmals in den späten 1990er Jahren als ein Orphan-GPR identifiziert [135, 136] und im weiteren Verlauf mit den estrogenen Wirkungswegen in Verbindung gebracht. In der aktuellen Literatur wurde die Nomenklatur von GPR30 zu GPER1 (engl. G-protein coupled ER1) geändert [137].

GPR30 leitet bei Stimulation durch Estrogen das Signal über die verschiedenen, im vorherigen Abschnitt beschriebenen intrazellulären Signalmoleküle und Signalkaskaden weiter [133]. GPR30 bindet spezifisch 17 $\beta$ -Estradiol mit einer Dissoziationskonstante von 3 – 6 nM, während er für Estron (E1) und Estriol (E3) nur eine sehr geringe Affinität aufweist [122, 131, 133]. Interessanterweise bindet auch der ER-Antagonist ICI 182.780 am GPR30. ICI 182.780 inhibiert den nukleozytoplasmatischen Transport der beiden klassischen ER, wirkt am GPR30 jedoch agonistisch [131, 133, 138].

Bei der Aktivierung der MAPKs durch GPR30 spielt die Transaktivierung des Tyrosinkinaserzeptors EGFR (engl. Epidermal Growth Faktor Receptor) (vgl. Abbildung 3 (V)) eine wichtige Rolle. Dabei erfolgt neben der Phosphorylierung des EGFR die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die zur Freisetzung der an die Plasmamembran assoziierten Liganden, den Heparin-gebundenen epidermalen Wachstumsfaktoren (HB-EGF), führen. Diese interagieren mit dem EGFR und im weiteren Verlauf wird das

Signalsystem Ras/Raf/MAPK aktiviert und die Transkription estrogensensitiver Gene beeinflusst [96, 119, 122, 130]. Eine Transaktivierung des EGFR-Signalweges kann ebenso durch eine Aktivierung des membrangebundenen ER $\alpha$  ausgelöst werden (nicht dargestellt in Abbildung 3) [127]. EGF gilt durch seine Interaktion mit dem MAPK-Signalweg über den EGFR als negativer Regulator der Chondrogenese [139].

Um zwischen der Estrogenwirkung über klassische ER und der über GPR30 unterscheiden zu können, wurde der GPR30-Agonist G-1 identifiziert. G-1 bindet hochspezifisch mit einer Dissoziationskonstante von 11 nM an diesen Rezeptor. Damit weist er eine nur etwa zweifach niedrigere Affinität im Vergleich zu 17 $\beta$ -Estradiol auf [118, 140]. Weiter wurde mit G15, ein G-1 Analogon, ein GPR30-Antagonist gefunden, der mit ebenso hoher Affinität an GPR30 bindet und als Antagonist des Estrogen-vermittelten GPR30-Signalweges wirkt [141].

In der neueren Literatur finden sich Publikationen, die die Funktion des GPR30 als Estrogenrezeptor in Frage stellen. Otto und seine Kollegen (2008) konnten weder eine spezifische Bindung von E2 an GPR30 noch einen Anstieg der sekundären Signalmoleküle cAMP und Calcium nach seiner Stimulierung nachweisen. Auch der GPR30-Agonist G-1 konnte bei ihnen keine Estrogen-vermittelten Effekte nachahmen und seine Funktion in der differenzierten Betrachtung der Estrogenwege wird in Frage gestellt [142–144]. In Anbetracht der vielen Studien, die in verschiedenen Zelltypen einen eindeutigen Beweis für die Signalweiterleitung von Estrogen über GPR30 liefern, und der erfolgreichen Detektion von am GPR30 gebundenem Estrogen, scheint es jedoch unwahrscheinlich, dass GPR30 kein Estrogenrezeptor ist [137].

## 1.10 Projektbeschreibung und Vorergebnisse

In der Regenerativen Medizin stellt die Geweberegeneration von Knorpel aus humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) eine vielversprechende Methode zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten dar. Für die experimentellen Untersuchungen haben sich in den letzten Jahren funktionsfähige in vitro Kulturmodelle etabliert, die es ermöglichen, den Einfluss verschiedener Faktoren auf die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen. So werden sowohl unterschiedliche Trägermaterialien und mechanische Stimuli als auch Hormone und Wachstumsfaktoren auf ihre Effekte hin überprüft.

Der Gelenkknorpel ist ein hormonsensitives Gewebe. Den Sexualhormonen, vor allem den Estrogenen, wird eine wichtige Rolle bei der Regulation des gesunden Knorpelstoff-

wechsels, aber auch bei der Entstehung pathologischer Prozesse zugeschrieben. Eine Beeinflussbarkeit der chondrogenen Differenzierung von MSCs durch Sexualhormone wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Darum sollte im Rahmen dieses Projektes erstmals der Einfluss der Sexualhormone und im Speziellen des Estrogens  $17\beta$ -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung von hMSCs im dreidimensionalen, hochdichten Kultursystem untersucht werden.

Im Folgenden erfolgt eine Zusammenfassung der zu Beginn dieser Arbeit bereits bestehenden Vorergebnisse, die als erste Untersuchungen zum Einfluss von Sexualhormonen auf die chondrogene Differenzierung von hMSCs im Rahmen der naturwissenschaftlichen Doktorarbeit von Zsuzsa Jenei-Lanzl und der medizinischen Doktorarbeit von Katharina Ehehalt durchgeführt wurden.

### **1.10.1 Etablierung eines in vitro Chondrogenesemodells**

Viele Arbeitsgruppen verwenden verwandte Protokolle zur Isolierung, Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen. Das Modell der in vitro Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen, das für die Untersuchungen zum Einfluss der Sexualhormone verwendet wurde, wurde von Prof. Dr. Peter Angele etabliert. Die Isolierung und Proliferation der hMSCs wird nach Haynesworth [145], Lennon [80] und Pittenger [40] nach dem Prinzip der Percolldichtegradienten-Fraktionierung und anschließender Selektion der Zellen durch Adhärenz an der Plastikoberfläche der Zellkulturgefäße durchgeführt. Die chondrogene Differenzierung der expandierten MSCs erfolgt unter den chondrogenen Faktoren Dexamethason und TGF- $\beta$ 1 nach dem Model von Johnstone und seinen Kollegen (1998) in Form von hochdichten Zellaggregaten, den so genannten Pellets [81]. Dieses dreidimensionale Kultursystem eignet sich gut, den Einfluss von Hormonen und Wachstumsfaktoren auf die Chondrogenese zu untersuchen [38].

Die verwendeten Methoden zur Isolierung, Expansion und Differenzierung der hMSCs (vgl. Abschnitt 3.1 und 3.2) erwiesen sich als ein erfolgreiches Modell, mit dem die Proliferation der mesenchymalen Stammzellen und die chondrogene Differenzierung zu hyalin-ähnlichem Knorpel erzielt werden konnte.

### **1.10.2 Sexualhormonrezeptoren während der Chondrogenese**

Während des gesamten Zeitraumes der chondrogenen Differenzierung der hMSCs (Dauer: 21 Tage) konnten der Androgenrezeptor (AR), die beiden klassischen Estrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) sowie der membrangebundene Estrogenrezeptor GPR30 durch im-

munhistochemische Detektion nachgewiesen werden. GPR30 wurde hauptsächlich an der Zellmembran detektiert. Diese Lokalisation wurde an anderen Zellen bereits von Thomas und seinen Kollegen (2005) [133], Funakoshi und seinen Kollegen (2006) [134] und Filardo und seinen Kollegen (2007) [132] beschrieben.

Das Vorhandensein von Sexualhormonrezeptoren während der *in vitro* Chondrogenese der hMSCs spricht dafür, dass Sexualhormone bei der Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle zu einer Knorpelzelle eine Rolle spielen.

### 1.10.3 Steroidhormonzugabe in der Proliferationsphase

In einem ersten Versuch wurde untersucht, ob sich die Zugabe der Sexualhormone Dehydroepiandrosteron (DHEA),  $17\beta$ -Estradiol und Testosteron (Konzentration jeweils  $10^{-7}$  M) in der Phase der MSC-Proliferation auf die anschließende chondrogene Differenzierung auswirkt. Die Differenzierung erfolgte ohne den Zusatz von Sexualhormonen.

Die Sexualhormone DHEA,  $17\beta$ -Estradiol und Testosteron beeinflussten in der verwendeten Konzentration weder die Proliferation (Zellzahl und Zellaktivität) der mesenchymalen Stammzellen noch ihre anschließende chondrogene Differenzierung.

### 1.10.4 Steroidhormonzugabe in der Differenzierungsphase

In einem nächsten Schritt wurde die Wirkung der Sexualhormone DHEA,  $17\beta$ -Estradiol und Testosteron auf die chondrogene Differenzierung von hMSCs analysiert. Die Sexualhormone wurden in physiologischen Konzentrationen ( $17\beta$ -Estradiol in  $10^{-7}$  M und  $10^{-11}$  M, DHEA in  $10^{-7}$  M und  $10^{-10}$  M und Testosteron in  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  M) zugegeben [146]. Die vorgeschaltete MSC-Proliferation erfolgte im sexualhormonfreien MSC-Kulturmedium.

DHEA und Testosteron zeigten keinen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung der hMSCs. Die mit  $17\beta$ -Estradiol behandelten Zellaggregate wiesen neben einer geringeren makroskopischen Größe auch histologisch und biochemisch eine signifikant reduzierte Ablagerung der typischen extrazellulären Matrixbestandteile Kollagen Typ II und sGAG auf. Eine Verzögerung der Chondrogenese durch E2 zeigte sich nicht.

Von diesen Ergebnissen ausgehend fiel der Schwerpunkt der weiteren Untersuchungen auf die Charakterisierung des Einflusses von  $17\beta$ -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung der hMSCs.

### 1.10.5 Dosis-Wirkungs-Beziehung der Estrogenzugabe

Zunächst wurde die Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol auf die Chondrogenese der hMSCs in vier physiologischen Konzentrationen ( $E2\ 10^{-8}\text{ M}$ ,  $E2\ 10^{-9}\text{ M}$ ,  $E2\ 10^{-10}\text{ M}$  und  $E2\ 10^{-11}\text{ M}$ ) untersucht.

$17\beta$ -Estradiol führte in keiner der verwendeten Konzentrationen zu einer Verzögerung des Chondrogeneseprozesses. Die Zellaggregate, die mit  $E2\ 10^{-8}\text{ M}$  inkubiert wurden, wiesen jedoch im Verlauf der chondrogenen Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle und den anderen  $E2$ -Gruppen eine geringere makroskopische Größe und in der biochemischen Analyse eine signifikant verminderte Ablagerung der strukturellen Matrixkomponenten Kollagen Typ II und sGAG auf.

### 1.10.6 Beeinflussung der Östrogenwirkung durch ICI 182.780

Um die hemmende Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol bei  $10^{-8}\text{ M}$  auf die chondrogene Differenzierung der hMSCs genauer zu analysieren, wurde der Estrogenrezeptorantagonists ICI 182.780 ( $10^{-7}\text{ M}$ ) verwendet. ICI 182.780 ist eine Hemmsubstanz der beiden klassischen Estrogenrezeptoren ( $ER\alpha$  und  $ER\beta$ ).  $E2$  und ICI 182.780 wurden dem Differenzierungsmedium sowohl einzeln als auch zusammen beigelegt.

Die Zellaggregate, die mit  $E2$  oder ICI 182.780 allein und mit  $E2$  und ICI 182.780 zusammen behandelt wurden, unterschieden sich makroskopisch nicht voneinander und zeigten auch histologisch eine im Vergleich zur Kontrolle ähnlich schwache Anfärbung von sGAG und Kollagen Typ II. In den biochemischen Analysen wiesen sowohl die Aggregate, die mit ICI 182.780 allein, als auch diejenigen, die mit  $E2$  und ICI 182.780 zusammen behandelt wurden, eine im Vergleich zu der mit  $E2$  allein behandelten Gruppe noch weiter reduzierte Ablagerung der extrazellulären Matrixbestandteile sGAG und Kollagen Typ II auf.

ICI 182.780 konnte die  $E2$ -vermittelte Hemmung der Ablagerung knorpelspezifischer Matrixmoleküle nicht aufheben.

### 1.10.7 Zusammenfassung der Vorergebnisse

Während der chondrogenen Differenzierung konnten in den humanen MSCs intrazelluläre Sexualhormonrezeptoren ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , AR) und der membranassoziierte Estrogenrezeptor GPR30 nachgewiesen werden. Die Sexualhormone DHEA,  $E2$  und Testosteron hatten keinen Einfluss auf die Proliferation der hMSCs,  $17\beta$ -Estradiol führte jedoch während



der Phase der chondrogenen Differenzierung dosisabhängig bei  $10^{-8}$  M zu einer signifikant reduzierten Ablagerung der extrazellulären Knorpelbestandteile Kollagen Typ II und sGAG. Die Hemmung der Chondrogenese wurde durch die Zugabe von ICI 182.780 noch weiter verstärkt. ICI wurde neben seiner Funktion als Antagonist der klassischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  in der Literatur als Agonist an membranständigen Estrogenrezeptoren beschrieben [133].

Diese Ergebnisse wiesen die Richtung der weiteren Arbeit. Die Betrachtung und Analyse der membranvermittelten estrogenen Effekte auf die Hemmung der Chondrogenese von hMSCs stand nun im Vordergrund.

### 1.11 Fragestellungen dieser Arbeit

Der Gelenkknorpel zeigt bei Verletzung nur ein geringes Potential zur Selbstheilung. Die Behandlung von Knorpelschäden stellt in der Medizin ein großes Problem dar, da Verletzungen des Knorpels zu Schmerzen und Bewegungseinschränkung führen und als Langzeitfolge die Entstehung von degenerativen Gelenkerkrankungen droht [4]. Es sind verschiedene Verfahren zur Regeneration und Reparatur von verletztem Gelenkknorpel entwickelt worden. Im klinischen Alltag werden die Methode der Refixation, knochenmarkstimulierende Techniken, die osteochondrale Rekonstruktion, die Perichondrium- und Periostlappenplastik, die Autologe Chondrozyten Transplantation und die Osteotomie durchgeführt. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass mit diesen Verfahren die Symptome der meisten Patienten mittelfristig gebessert werden, keine Methode jedoch langfristig den hohen Anforderungen von hyalinem Knorpelgewebe genügt [7].

Es besteht großes Interesse an der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten. In der Regenerativen Medizin steht der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen zur Wiederherstellung von Knorpeldefekten im Vordergrund. Wie man die chondrogene Differenzierung der MSCs durch den Einsatz verschiedener Trägermaterialien, mechanischer Stimuli, Wachstumsfaktoren und Hormone optimieren kann, ist Gegenstand intensiver Forschung. Die Identifikation von Faktoren, die die Geweberegeneration von Knorpel beeinflussen, bringt den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen in der klinischen Anwendung einen Schritt weiter.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol (Konzentration  $10^{-8}$  M) auf die chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen männlicher Knochenmarkspender zu untersuchen.

(1) Der erste Schwerpunkt lag bei der Identifizierung estrogensensibler Phasen im Ver-

lauf der chondrogenen Differenzierung. Es wurde untersucht, ob die hemmende Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-8}$  M) auf die chondrogene Differenzierung der hMSCs während des gesamten 21-tägigen Differenzierungsprozesses oder nur zu einem bestimmten Zeitpunkt erfolgt.

Bei den nächsten Fragestellungen ((**2**), (**3**) und (**4**)) wurden die membranvermittelten Effekte von  $17\beta$ -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung der hMSCs genauer charakterisiert.

(**2**) Es wurde untersucht, ob das membranimpermeable Konjugat E2-BSA ( $10^{-8}$  M) den Prozess der Chondrogenese beeinflusst. Zusätzlich wurde analog zu Fragestellung (**1**) bewertet, ob dieser Einfluss in zeitlich sensiblen Phasen erfolgt.

(**3**) Als nächstes wurde die Beteiligung des membranassoziierten Estrogenrezeptors GPR30 an der Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung der hMSCs analysiert. Für die Untersuchung wurden  $17\beta$ -Estradiol, E2-BSA, ICI 182,780 und der spezifische GPR30-Agonist G-1 (jeweils in  $10^{-8}$  M) verwendet.

(**4**) Schließlich wurde versucht, die estrogenen Effekte, die über den membranständigen Estrogenrezeptor GPR30 auf die Chondrogenese der hMSCs vermittelt werden, mit Hilfe des spezifischen GPR30-Antagonisten G15 ( $10^{-8}$  M) zu blockieren.

In einem letzten Teil wurde überprüft, ob  $17\beta$ -Estradiol die chondrogene Differenzierung von hMSCs weiblicher Spenderinnen auf gleiche Weise beeinflusst, wie die von hMSCs männlicher Spender.

(**5**) Es wurde beobachtet, wie sich die Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol zu hMSCs weiblicher Spenderinnen auf die chondrogene Differenzierung dieser auswirkt. Dabei wurde nach einer Dosis-Wirkungs-Beziehung einer E2-Zugabe (E2  $10^{-8}$  M, E2  $10^{-9}$  M, E2  $10^{-10}$  M und E2  $10^{-11}$  M) gesucht (analog zu Versuch 1.10.5 der Vorergebnisse).

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Autoklav Melatronik 23	Melag, Berlin
Brutschrank CO <sub>2</sub> HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Digitalkamera Polaroid DMC 3	Polaroid, Dreieich-Sprendlingen
Digital pH-Meter	Knick, Berlin
Elektronikrührer Monotherm	Variomag, Leipzig
Färbekammer Coverplates	Thermo Shandon, Frankfurt a. M.
Homogenisator Xenox 40/E	Xenox, Niersbach
Kryostat Microm HM 500 OM	Microm, Berlin
Microplate Reader Tecan Genios	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Mikroskop Fluovert FU	Leitz, Wetzlar
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000U	Nikon GmbH, Düsseldorf
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Giessen
Pipettierhilfe Falcon Express	BD Falcon, Heidelberg
Rotator	Kisker-Biotech, Steinfurt
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe	Vacubrand, Wertheim
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage EW 4200-2NM	Kern, Balingen-Frommern
Waage 440-43	Kern, Balingen-Frommern
Waage 770-60	Kern, Balingen-Frommern
Wasserbad	GFL, Bergwedel
Wasser-Deionisations-/Defiltrieranlage	Millipore, Biocel, Billerica, USA
Wippe Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Combi-Spin FVL 2400	Kisker-Biotech, Steinfurt
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Combitips plus 0,1/0,5/1/5/10 ml	Eppendorf, Hamburg
Cryogenic Vials 2 ml	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Deckgläser 24 × 24 mm, 24 × 32 mm	Roth, Karlsruhe
Dosiernadeln	PK Electronic, Ettlingen
Filtereinheit Microcon	Millipore, Schwalbach
Kanülen 18/20/27G	BD Falcon, Heidelberg
Mikrotiterplatten	TPP, Schweiz
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Objektträger Star Frost	Knittel Gläser, Braunschweig
Parafilm M	Pechiney, Chicago
Pipetten Costar Stripette 1/5/10/25/60 ml	Corning, Corning USA
Pipettensets 10/100/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen ep Tips dualfilter 10/100/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenzentrifugenröhrchen	NeoLab, Heidelberg
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
Rasierklingen Double Edge Stainless Steel	Science Services, München
Reaktionsgefäße 0,2/1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Serum Röhrchen 5,5 ml S-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen 5/10 ml	BD Falcon, Heidelberg
Sterifilter 0,2 µm	Sartorius, Göttingen
Sterifilter 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 96-Well	Falcon Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15/50 ml	Falcon, Heidelberg

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe

Chromalaun Chrom (III) Kaliumsulfatdecahydrat	Omikron, Neckarwestheim
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Cobalt Chlorid ( $\text{CoCl}_2$ )	Sigma Aldrich, Steinheim
Chondroitinsulfat A	Sigma Aldrich, Steinheim
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
DePex	Serva, Heidelberg
p-Dimethylaminobenzaldehyd p-DAB	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Diaminobenzidin (DAB) 0,5 %	Sigma Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim
1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 2,5 N	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Baker, Deventer, Holland
Ethylenglycol	Roth, Karlsruhe
Formalin 37 %	Merck, Darmstadt
Gelatine (Schwein)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin 25030-024	Gibco, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutardialdehyd	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES 1 M	Sigma Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Cystein	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid 2,7 N	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Nickel Chlorid ( $\text{NiCl}_2$ )	Sigma Aldrich, Steinheim
Para-Formaldehyd 4 %	Riedel-de Haën, Sigma Aldrich, Steinheim

Penicillin-Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Percoll	Biochrom, Berlin
Percoll	Sigma Aldrich, Steinheim
Phenylhydrazin	Sigma Aldrich, Steinheim
Prolin 81709	Fluka, Deutschland
2-Propanol 100 %	Merck, Darmstadt
Salzsäure HCl 37 % rauchend	Merck, Darmstadt
Tetrabutylammoniumborohydride	Sigma Aldrich, Steinheim
Tissue Tec	Sakura, Zoeterwoude, NL
ToluidineBlue O	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris Pufferan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin EDTA	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
TWEEN 200	Sigma Aldrich, Steinheim
Tyrode	Sigma Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Hohenbrunn

## 2.4 Medien, Medienzusätze und Seren

Fetal Bovine Serum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Goat Serum	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/Liter)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) Low Glucose (1,0 g/Liter)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
ITS+3	Sigma Aldrich, Steinheim
TGF- $\beta$ 1 (TGF Lyophilisat in 10 ml TGF-Puffer)	R&D Systems, Wiesbaden
Ascorbinsäure-2-Phosphat 20 mM (0,1024 g Ascorbinsäure, 20 ml Tyrodes)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dexametason Stock 1 mM (0,00392 g Dexametason in 10 ml 100 % Ethanol)	Sigma Aldrich, Steinheim

Dexametason Gebrauch $10\ \mu\text{M}$ ( $200\ \mu\text{l}$ Stocklösung in $19,8\ \text{ml}$ DMEM Low Glucose)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe

**Medium für mesenchymale Stammzellkulturen (MSC-Kulturmedium):**

DMEM mit niedrigem Glukosegehalt ( $1,0\ \text{g/Liter}$ ) enthält 10 % FCS und 10 % Penicillin-Streptomycin.

**Medium für Chondrogenese (Chondrogenesemedium):**

DMEM mit hohem Glukosegehalt ( $4,5\ \text{g/Liter}$ ) enthält L-Prolin ( $40\ \mu\text{g/ml}$ ), Natriumpyruvat ( $1\ \text{mM}$ ), 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % IST+3 (1:100 v/v), 1 % Dexamethason ( $100\ \text{nM}$ ), 1 % Ascorbinsäure-2-Phosphat ( $0,2\ \text{mM}$ ) und 0,5 % human TGF $\beta$ -1 recombinant ( $10\ \text{ng/ml}$ ).

## 2.5 Spezifische Medienzusätze

Testosteron T 1500	Sigma Aldrich, Steinheim
Trans-Dehydroepiandrosteron D 4000 (DHEA)	Sigma Aldrich, Steinheim
$17\beta$ -Estradiol (E2), E8875 ( $2,7239\ \text{mg}$ in $10\ \text{ml}$ Ethanol 100 %)	Sigma Aldrich, Steinheim
E2-BSA $10\ \text{mM}$ ( $5\ \text{mg}$ E2-BSA in $2,085\ \text{ml}$ PBS)	Sigma Aldrich, Steinheim
ICI 182,780 $10\ \text{mM}$ ( $10\ \text{mg}$ ICI 182,780 in $16,48\ \text{ml}$ Ethanol 100 %)	Tocris/BIOZOL Diagnostika GmbH, Eching
G1 $10\ \text{mM}$ ( $5\ \text{mg}$ G1 in $12,1\ \text{ml}$ Ethanol 100 %)	Merck, Darmstadt
G15	M. Hager, Prof. Dr. O. Reiser, Organische Chemie, Universität Regensburg

## 2.6 Antikörper und Enzyme

Anti-Kollagen Typ II (mouse antitype II collagen IgG1, 1:100)	Calbiochem, Darmstadt
Sekundärer Antikörper (goat anti mouse IgG, 1:100)	Dianova, Hamburg
Biotin-Streptavidin-Komplex	Vectastain ABC Kit, Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Elastase (Pankreas)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pepsin	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin EDTA	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe

## 2.7 Puffer und Lösungen

### 2.7.1 Histologie

DMMB-Färbelösung (pH 3,0):	40 mM NaCl + 40 mM Glycin + 46 $\mu$ l Dimethylmethylenblau
Gelatine-Lösung für Objektträger:	50 ml H <sub>2</sub> O + 0,5 g Gelatine + 0,05 g Chromalaun + 125 $\mu$ l Glutaraldehyd
Methylformalin- Fixierungslösung:	5 ml 0,2 M Phosphat-Puffer + 25 ml Para-Formaldehyd-Lösung 37 % + 50 ml Methanol 100 %
Methanol- Phosphatpuffer:	100 ml 0,2 M Phosphatpuffer + 100 ml Methanol 100 %
Phosphatpuffer 0,2 M:	500 ml 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat + 100 ml 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat



Saccharose Lösungen:	Eine Saccharoselösung in einer bestimmten Konzentration wurde hergestellt, indem die benötigte Menge an Saccharose abgewogen und in 0,1 M Phosphatpuffer gelöst wurde.
Standardfixierungs- Lösung:	0,1 M Phosphatpuffer + 4 % Paraformaldehyd + 1 % Glutaraldehyd
Toluidinblau Färbelösung 0,1 %:	99,9 g Aqua dest. + 0,1 g Toluidinblau

### 2.7.2 Immunhistochemie

ABC-Komplex:	2,5 ml m-PBS-Puffer + ABC-Kit: je ein Tropfen Reagenz A und B Vor der Verwendung 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur.
Blockingpuffer:	60 ml Aqua dest. + 120 ml Trispuffer 0,2 M + 2400 mg NaCl 0,8 % + 60 ml Triton 4 % + 30 ml Ziegenserum 10 % + 30 ml fetales Rinderserum 10 %
Diaminobenzidin Arbeitslösung:	1 ml Diaminobenzidin Stammlösung + 9 ml 0,1 M m-PBS-Puffer + 400 $\mu$ l NiCo-Lösung + 6 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %
Diaminobenzidin Stammlösung 10X:	10 ml Aqua dest. + 10 mg BSA + 50 mg Diaminobenzidin
McIlvaine-Puffer (pH 3,6):	67,8 ml 0,1 M Zitronensäure + 32,2 ml 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

m-PBS-Puffer 1 M (pH 7,0-7,4):	47,2 g Kaliumdihydrogenphosphat + 6,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat + 36,0 g NaCl + mit Aqua dest. auf 500 g auffüllen
NiCo-Lösung:	10 ml Aqua dest. + 100 mg NiCl <sub>2</sub> + 5 mg CoCl <sub>2</sub> + 10 mg BSA
Pepsin-Andaulösung:	40,1 g Pepsin + 99,9 ml McIlvaine-Puffer (pH 3,6)
Peroxidase Blocking-Puffer:	40 ml PBS + 5 ml Methanol + 5 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %
Trispuffer 0,2 M:	1000 ml Aqua dest. + 24,225 M Tris + mit HCl 37 % auf pH 7 einstellen
Waschpuffer:	2220 ml Aqua dest. + 780 ml Trispuffer 0,2 M + 24,96 g NaCl

### 2.7.3 Elisaverdau

TBS 10X (pH 7,8-8,0):	100 ml Aqua dest. + 12,144 g Tris + 11,688 g NaCl + 0,55 g CaCl <sub>2</sub>
Essigsäure-Lösung CH <sub>3</sub> COOH 0,05 M:	100 ml Aqua dest. + 0,30025 g CH <sub>3</sub> COOH

CH<sub>3</sub>COOH/NaCl- 90 ml Aqua dest.  
 Lösung (pH 2,9-3,0): + 2,922 g NaCl  
 + 0,30025 g CH<sub>3</sub>COOH

#### 2.7.4 Sonstige Lösungen

Tyrode's Lösung: 990 ml H<sub>2</sub>O  
 + 9,73 g Tyrode Salz  
 + 0,2 g NaHCO<sub>3</sub>  
 + 10 ml Penicillin-Streptomycin

TGF-Puffer: 12 ml H<sub>2</sub>O  
 + 12,5 mg BSA  
 + 0,5 ml 0,1 N HCL

DMMB-Lösung 5,0 ml Ethanol 100 %  
 (pH 3,0): + 18,0 mg 1,9 Dimethylmethylenblau  
 + 2,0 ml Ameisensäure  
 + 2,0 g NaCl

DMMB-Assey 50 ml PBS  
 Verdünnungspuffer: + 0,0363 g L-Cystein  
 + 0,1117 g Na<sub>2</sub>EDTA

Percoll-Lösung: 22,05 ml Percoll  
 + 2,45 ml NaCl 1,5 M  
 + 10,50 ml Tyrodes Lösung

#### 2.8 Test-Kits

ABC-Kit	Vectorlabs, Burlingame, CA, USA
Quant – iT <sup>TM</sup> PicoGreen dsDNA Kit	Invitrogen, Oregon, USA
Native Type II Collagen Detection Kit 6009	Chondrex Inc, Redmont, WA, USA

## 2.9 Zellmaterial

Humane mesenchymale Stammzellen wurden im Rahmen diese Arbeit von 21 männlichen adulten Spendern und acht weiblichen adulten Spendern im Alter von 17-47 Jahren verwendet.

## 2.10 Computerprogramme

Software SigmaStat 32 für Windows	Systat Software GmbH, Erkrath
Tabellensoftware SigmaPlot 10.0 für Windows	Systat Software GmbH, Erkrath

## 3 Methoden

### 3.1 Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

#### 3.1.1 Zellgewinnung aus dem Knochenmark

Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturen humaner MSCs wurden aus Knochenmarkaspiraten des Darmbeinkamms adulter Spender unterschiedlichen Geschlechts und Alters angelegt. Die Entnahme erfolgte im Rahmen geplanter operativer Eingriffe nach freiwilliger Zustimmung der Patienten. Die Knochenmarkaspirate wurden zur Gerinnungshemmung unmittelbar mit Heparin versetzt, auf Eis transportiert und direkt weiterverarbeitet.

Die Isolierung humaner MSCs aus dem Knochenmark erfolgte nach dem Prinzip der Percoll Dichtegradienten-Fraktionierung (Dichte 1,077 g/ml) mit anschließender Selektion der Zellen durch Adhärenz an die Plastikoberfläche der Zellkulturgefäße [40, 80, 145].

#### Durchführung

Das frisch gewonnene Knochenmarkmaterial wurde im Verhältnis von 1 : 4 mit serumhaltigem MSC-Kulturmedium (DMEM niedriger Glukosegehalt, 10 % FCS, 10 % Penicillin-Streptomycin) verdünnt und vorsichtig über 15 ml des Percoll-Dichtegradienten geschichtet. Während der 15-minütigen Zentrifugation bei 1000 U/Min und Raumtemperatur (RT) bildeten vor allem die Erythrozyten und reifen Granulozyten ein Pellet auf dem Boden des Röhrchens. Die mononukleären Knochenmarkzellen, zu denen auch die mesenchymalen Stammzellen zählen, formten eine weißliche Schicht am Übergang zwischen dem Percollgradienten und dem verdünnten Aspirat. Diese Zellschicht wurde vorsichtig mit einer 5 ml Pipette aufgenommen und in einem neuen Zentrifugenröhrchen mit frischem MSC-Kulturmedium versetzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/Min und RT, Absaugen des Überstandes und erneuter Aufnahme des Pellets in 5 ml MSC-Kulturmedium, wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bevor die hMSCs in einer Dichte von 2 Millionen Zellen pro Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) ausgesät wurden, wurden die Zellkulturflaschen mit 15 ml MSC-Kulturmedium vorbegefüllt. Die Zellen wurden durch leichtes Schwenken gleichmäßig in den Flaschen verteilt und bei 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Bei dem ersten Mediumwechsel nach 7 Tagen wurden nicht-adhärenente Zellen (hämatopoetische Zellen) abgesaugt und die adhärenenten Zellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, weiterkultiviert [40, 70, 145]. Die weiteren Medienwechsel erfolgten alle 3-4 Tage.

### 3.1.2 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität wurden Trypanblau und eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Trypanblau ist ein Farbstoff, der durch die Membran lebender Zellen zurückgehalten wird. Tote Zellen mit defekter Membran sind für den Farbstoff permeabel und färben sich blau an.

Für die Auszählung wurden gleiche Volumina Zellsuspension und Trypanblau-Lösung gemischt, in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und unter einem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl (Z) ergab sich aus dem Mittelwert (MW) der Anzahl lebender (ungefärbter) Zellen aus vier ausgezählten Quadranten nach der Umrechnungsformel  $Z = MW \times L \times 10^4$ . L ist der Verdünnungsfaktor der Zellsuspension und  $10^4$  der Kammerfaktor.

Die Vitalität errechnete sich aus dem Verhältnis der Lebendzellzahl (ungefärbte Zellen) zur Gesamtzellzahl (ungefärbte und blau gefärbte Zellen).

### 3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

#### Einfrieren von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen im Gefrierschrank bei  $-80^\circ\text{C}$  oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Einfrieren erfolgte in DMSO-haltigem Medium, das aus dem Standardmedium DMEM Low Glucose (1,0 g/Liter) und dem Zusatz von FCS (40 %) und DMSO (10 %) hergestellt wurde. DMSO unterbindet eine die Zellwand und Zellorganelle schädigende Kristallbildung. Das DMSO-haltige Medium wurde vor der Verwendung steril filtriert und auf Eis vorgekühlt.

Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde die einzufrierende Kultur mit PBS gespült und mit Trypsin (3 ml pro  $75\text{ cm}^2$  Kulturflasche) überschichtet. Durch Inkubation und intermittierendes Schwenken löste sich der Zellrasen nach 3-5 Minuten vom Boden der Kulturflasche ab. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde der Zellsuspension die doppelte Menge an serumhaltigem MSC-Kulturmedium (6 ml pro  $75\text{ cm}^2$  Kulturflasche) zugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1000 U/Min und RT für 12 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nachdem die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, wurde die Zellsuspension mit DMSO-haltigem Medium in einer solchen Menge aufgefüllt, dass in die Cryocups jeweils 1 ml mit bis zu  $8 \cdot 10^6$  Zellen gegeben werden konnte. Die Röhrchen wurden über Nacht bei  $-80^\circ\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert und verblieben entweder dort oder wurden am folgenden Tag in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### **Auftauen von Zellen**

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder im flüssigen Stickstoff tiefgefrorenen Zellen wurden zunächst auf Eis gelagert und durch vorsichtiges Schwenken in einem warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde mit 9 ml MSC-Kulturmedium versetzt und für 10 Minuten bei 1000 U/Min und RT zentrifugiert. Dabei wurden die Reste des Einfriermediums (50 % MSC-Kulturmedium, 40 % FBS und 10 % DMSO) entfernt. Das entstandene Zellpellet wurde in MSC-Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl und Vitalität in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. In die mit jeweils 15 ml MSC-Kulturmedium vorbefüllten Zellkulturflaschen wurde die Zellsuspension in einer Dichte von 200.000 Zellen pro Kulturflasche ( $75\text{ cm}^2$  Kulturflasche) ausgesät. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Zellkulturflaschen bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

#### **3.1.4 Amplifizierung**

Die Expansion der aus dem Knochenmark gewonnenen und in Kulturflaschen ausgesäten humanen MSCs erfolgte als Monolayer-Kultur (vgl. Abbildung 4). Bei dem Erreichen einer 80 %-igen Konfluenz wurden die Zellkulturen entweder passagiert, eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Dies ist wichtig, denn sobald eine Kulturflasche vollständig mit Zellen besiedelt ist (Konfluenz), kann eine Beeinträchtigung des Wachstums aufgrund einer Kontaktinhibierung erfolgen [147].

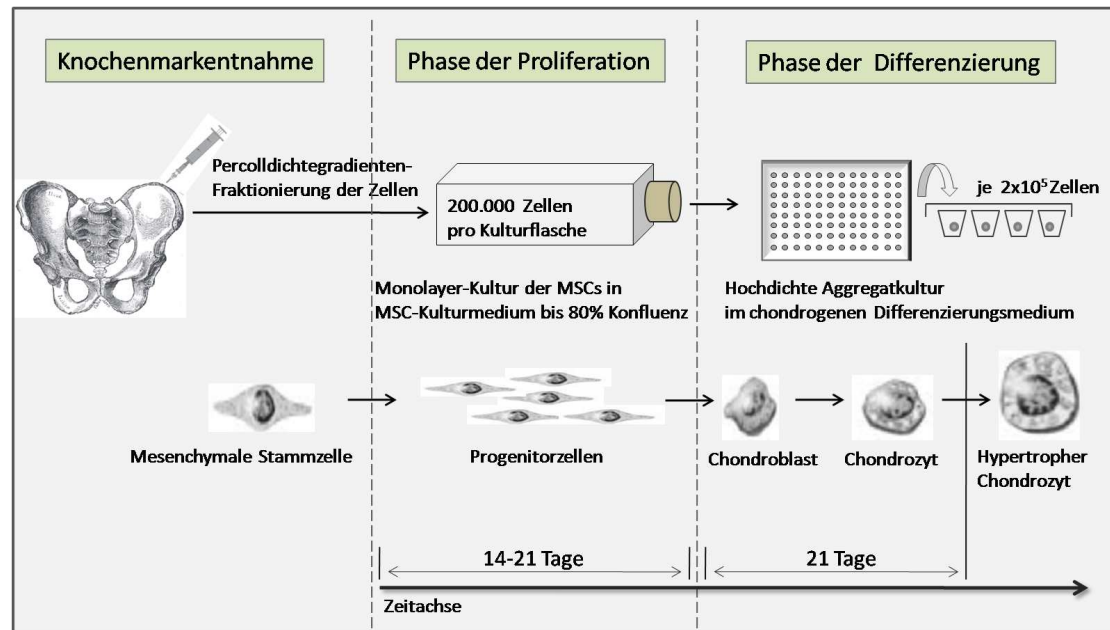
Für jeden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsteil wurden die tiefgefrorenen MSC-Kulturen nach Abschnitt 3.1.3 aufgetaut. In der Phase der Proliferation (Dauer 14-21 Tage) wurden die mesenchymalen Stammzellen auf etwa das 5-fache amplifiziert. Dies wurde erreicht, indem sich die je 200.000 pro Kulturflasche ausgesäten Zellen unter der Zugabe von MSC-Kulturmedium bis zu einem Zellrasen mit etwa 80 %-iger Konfluenz vermehrten. Der Mediumwechsel während der Proliferationsphase erfolgte alle 3-4 Tage. Die Kulturflaschen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

### **3.2 In vitro Chondrogenesemodell**

An die Phase der Proliferation schloss sich die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen nach dem Modell von Johnstone und seinen Kollegen (1998) in Form der hochdichten Zellaggregate, den so genannten Pellets, an (vgl. Abbildung 4) [81]. Das serumfreie Differenzierungsmedium DMEM mit hohem Glukosegehalt enthielt zur

Induktion der Chondrogenese Dexamethason und TGF- $\beta$ 1 sowie die weiteren Faktoren IST+3, Ascorbinsäure und Pyruvat (vgl. Abschnitt 1.6).

In dieser Arbeit wurde pro Versuchsteil jeweils eine Gruppe an Zellpellets als Kontrollgruppe (sog. dex-Gruppe) mit dem chondrogenen Standardmedium behandelt. Bei den zu vergleichenden Versuchsgruppen wurde dem Differenzierungsmedium der zu testende, potentiell die Chondrogenese beeinflussende Faktor zugefügt.



**Abbildung 4:** Modell der in vitro Chondrogenese: Nach der Knochenmarkentnahme erfolgt die Isolierung humaner MSCs aus dem Knochenmark nach dem Prinzip der Percoll-dichtegradienten-Fraktionierung mit anschließender Selektion der Zellen durch Adhärenz an die Plastikoberfläche der Zellkulturgefäße. In der Phase der Proliferation expandieren die MSCs als Monolayer-Kultur in der Anwesenheit von serumhaltigem MSC-Kulturmedium bis zu einer Konfluenz von 80% (Dauer: 14-21 Tage). Die anschließende Phase der Differenzierung erfolgt in 96-Wellplatten als hochdichte Aggregatkultur in serumfreiem chondrogenen Differenzierungsmedium (Dauer: 21 Tage). Die MSCs differenzieren über Progenitorzellen und Chondroblasten zu Chondrozyten.

### Durchführung

Die Chondrogenese wurde in Zellpellets durchgeführt. Nach dem Absaugen des MSC-Kulturmediums wurde die zu pelletierende Kultur mit PBS gespült und mit Trypsin (3 ml pro 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche) überschichtet. Durch Inkubation und intermittierendes Schwenken löste sich der Zellrasen nach 3-5 Minuten vom Boden der Kulturflasche ab. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde die doppelte Menge an vorgewärmtem, serumhaltigem



MSC-Kulturmedium zugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt, bei 1000 U/Min und RT für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nachdem die Pellets in frischem chondrogenen Differenzierungsmedium resuspendiert und die Zellsuspensionen einer Zellkultur in einem Zentrifugenröhrchen zusammengeführt wurden, wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je nach Versuchsdesign wurde die Zellsuspension auf die Anzahl der Vergleichsgruppen aufgeteilt und bei 1000 U/Min und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellpellets mit chondrogenem Differenzierungsmedium und den zu testenden Medienzusätzen versetzt. Die Menge des Mediums wurde hierbei so gewählt, dass die Löcher der 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 350  $\mu\text{l}$  chondrogenem Medium und einer Anzahl von  $2 \cdot 10^5$  Zellen befüllt werden konnten. Die in die Löcher der 96-Well-Mikrotiterplatten pipettierte Zellsuspension aus hMSCs und Differenzierungsmedium wurde bei 2000 U/Min und RT für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nicht verworfen und die gebildeten Pellets nicht mehr resuspendiert. Der Wechsel des Mediums erfolgte 3-mal wöchentlich mit je 350  $\mu\text{l}$  induzierendem Medium. Die Zellen wurden bei 37° C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

Die Gesamtdauer der chondrogenen Differenzierung betrug 21 Tage. Nach 1-, 7-, 14- und 21-tägiger Stimulation wurden jeweils Pellets für die Makroskopie, Histologie und Immunhistochemie, am Tag 21 noch zusätzlich Zellaggregate für die biochemische Bestimmung des DNA-, sGAG- und Kollagen Typ II -Gehalts entnommen.

### 3.2.1 Sequenzielle Zugabe von $17\beta$ -Estradiol

Um die hemmende Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol bei  $10^{-8}$  M auf die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen genauer zu verstehen, wurde  $\text{E}2$   $10^{-8}$  M sequenziell in klar definierten Zeiträumen hinzugegeben. Dadurch wurde untersucht, ob die Chondrogenesehemmung durch  $17\beta$ -Estradiol während des gesamten 21-tägigen Differenzierungszeitraums erfolgt oder nur zu einem bestimmten Zeitpunkt stattfindet.

Es wurden neben den Pellets, die als Kontrollgruppe (Gruppe 1) mit dem chondrogenen Standardmedium (dex  $10^{-7}$  M) behandelt wurden, vier weitere Gruppen gebildet, bei denen die Zugabe von  $\text{E}2$   $10^{-8}$  M entweder von Tag 0-7 (Gruppe 2), von Tag 7-14 (Gruppe 3), von Tag 14-21 (Gruppe 4) oder während der gesamten 21 Tage (Gruppe 5) erfolgte (vgl. Tabelle 2).

Dieser Versuch wurde mit hMSCs von fünf männlichen adulten Spendern durchgeführt (n=5).

Gruppe	Zugabe Basis	Tage	Zugabe Speziell	Tage
1 (Kontrollgruppe)	dex $10^{-7}$ M	0-21	-	-
2	dex $10^{-7}$ M	0-21	E2 $10^{-8}$ M	0-7
3	dex $10^{-7}$ M	0-21	E2 $10^{-8}$ M	7-14
4	dex $10^{-7}$ M	0-21	E2 $10^{-8}$ M	14-21
5	dex $10^{-7}$ M	0-21	E2 $10^{-8}$ M	0-21

**Tabelle 2:** Darstellung der sequenziellen Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol

### 3.2.2 Sequenzielle Zugabe von E2-BSA

$17\beta$ -Estradiol wirkt sowohl über intrazelluläre ER (klassischer Weg) als auch über membranassoziierte Rezeptoren (nicht-klassischer Weg). Bei der Charakterisierung nicht-klassischer Effekte ist die räumliche Trennung von E2 vom Zellinneren von Bedeutung. An BSA konjugiertes E2 ist nicht mehr membrangängig und wurde verwendet, um die membranvermittelte Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol auf die Chondrogenese zu untersuchen [148, 149].

Die Herstellung von E2-freiem E2-BSA erfolgte durch die Zentrifugation einer  $10^{-3}$  M E2-BSA-Lösung (5 ml E2-BSA auf 2,085 ml PBS) unter sterilen Bedingungen. Hierfür wurde eine Microcon Filtereinheit (Trennwert 3 kDa) mit gelöstem BSA (1mg/ml) beschichtet, 400  $\mu$ l der E2-BSA-Lösung zugegeben und bei 13000 U/Min für etwa 30 Minuten zentrifugiert. Das Retentat wurde mit PBS-Puffer gewaschen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Volumen auf 400  $\mu$ l aufgefüllt [148, 149]. So behandelte E2-BSA-Lösungen wurden im Gefrierschrank auf  $-80^{\circ}$  C gelagert und jeweils direkt vor der Verwendung aufgetaut.

Die Zugabe von E2-BSA erfolgte in klar definierten Zeiträumen, um analog zu Abschnitt 3.2.1 bestimmte Phasen zu identifizieren, in denen E2-BSA die Chondrogenese der hMSCs über nicht-klassische Effekte beeinflusst. Es wurden neben der Kontrollgruppe, die mit dem chondrogenen Basismedium (dex  $10^{-7}$  M) behandelt wurde, vier weitere Gruppen gebildet, bei denen die Zugabe von E2-BSA  $10^{-8}$  M entweder von Tag 0-7 (Gruppe 2), von Tag 7-14 (Gruppe 3), von Tag 14-21 (Gruppe 4) oder während der gesamten 21 Tage (Gruppe 5) erfolgte (vgl. Tabelle 3).

Dieser Versuch wurde mit hMSCs von vier männlichen adulten Spendern durchgeführt (n=4).

Gruppe	Zugabe Basis	Tage	Zugabe Speziell	Tage
1 (Kontrollgruppe)	dex $10^{-7}$ M	0-21	-	-
2	dex $10^{-7}$ M	0-21	E2-BSA $10^{-8}$ M	0-7
3	dex $10^{-7}$ M	0-21	E2-BSA $10^{-8}$ M	7-14
4	dex $10^{-7}$ M	0-21	E2-BSA $10^{-8}$ M	14-21
5	dex $10^{-7}$ M	0-21	E2-BSA $10^{-8}$ M	0-21

**Tabelle 3:** Darstellung der sequenziellen Zugabe von E2-BSA

### 3.2.3 Untersuchung nicht-klassischer Estrogeneffekte über GPR30

Um die Beteiligung des membranständigen E2-Rezeptors GPR30 an der Hemmung der Chondrogenese zu untersuchen, wurden das membranimpermeable Konjugat E2-BSA, ICI 182.780 in seiner Rolle als GPR30-Agonist und G-1 als selektiver GPR30-Agonist hinzugegeben. Bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M weisen E2, E2-BSA, ICI 182.780 und G-1 eine ähnliche Bindungsaffinität am GPR30 auf [150]. Die Verwendung von G-1 als selektiven GPR30-Agonisten ist von Bedeutung, da er hilft, zwischen der Estrogenwirkung über die klassischen ER  $\alpha$  und  $\beta$  und dem membranen ER GPR30 zu unterscheiden.

Neben der Kontrollgruppe, die mit dem chondrogenen Basismedium (dex  $10^{-7}$  M) inkubiert wurde, wurden vier weitere Gruppen gebildet, die entweder mit E2  $10^{-8}$  M (Gruppe 2), E2-BSA  $10^{-8}$  M (Gruppe 3), ICI 182.780  $10^{-8}$  M (Gruppe 4) oder G-1  $10^{-8}$  M (Gruppe 5) behandelt wurden (vgl. Tabelle 4).

Dieser Versuch wurde mit hMSCs von vier männlichen adulten Spendern durchgeführt (n=4).

Gruppe	Zugabe Basis	Zugabe Speziell
1 (Kontrollgruppe)	dex $10^{-7}$ M	-
2	dex $10^{-7}$ M	E2 $10^{-8}$ M
3	dex $10^{-7}$ M	E2-BSA $10^{-8}$ M
4	dex $10^{-7}$ M	ICI 182.780 $10^{-8}$ M
5	dex $10^{-7}$ M	G-1 $10^{-8}$ M

**Tabelle 4:** Darstellung der Zugabe von E2, E2-BSA, ICI 182.780 und G-1 zur Untersuchung nicht-klassischer Estrogeneffekte über GPR30.

### 3.2.4 Blockierung nicht-klassischer Estrogeneffekte über GPR30

Um die hemmende Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol bei  $10^{-8}$  M auf die chondrogene Differenzierung über den membranassoziierten Rezeptor GPR30 beweisen zu können, wurde der GPR30-Antagonist G15 verwendet. G15 ist ein G-1 Analogon, welches bei  $10^{-8}$  M mit hoher Affinität an GPR30 bindet und die Effekte von an diesem Rezeptor agonistisch wirkenden Substraten antagonisiert [141]. In der Annahme, dass die Faktoren E2 und G-1 über GPR30 einen hemmenden Effekt auf die Chondrogenese der hMSCs haben, sollte es durch die zusätzliche Zugabe von G15 zu einer Blockierung dieser nicht-klassischen, GPR30-vermittelten Effekte kommen.

Es wurden neben den Pellets, die als Kontrollgruppe mit dem chondrogenen Basismedium (dex  $10^{-7}$  M) behandelt wurden, fünf weitere Gruppen gebildet, die entweder mit E2  $10^{-8}$  M allein (Gruppe 2), mit einer Koinkubations aus E2  $10^{-8}$  M und G15  $10^{-8}$  M (Gruppe 3), mit G-1 allein (Gruppe 4), mit einer Koinkubation aus G-1  $10^{-8}$  M und G15  $10^{-8}$  M (Gruppe 5) oder mit G15 allein (Gruppe 6) behandelt wurden (vgl. Tabelle 5). Dieser Versuch wurde mit hMSC von acht männlichen adulten Spendern durchgeführt (n=8).

Gruppe	Zugabe Basis	Zugabe Speziell
1 (Kontrollgruppe)	dex $10^{-7}$ M	-
2	dex $10^{-7}$ M	E2 $10^{-8}$ M
3	dex $10^{-7}$ M	E2 $10^{-8}$ M+G15 $10^{-8}$ M
4	dex $10^{-7}$ M	G-1 $10^{-8}$ M
5	dex $10^{-7}$ M	G-1 $10^{-8}$ M+G15 $10^{-8}$ M
6	dex $10^{-7}$ M	G15 $10^{-8}$ M

**Tabelle 5:** Darstellung der Blockierung von GPR30 mit G15

### 3.2.5 Dosis-Wirkungs-Beziehung der Estrogenzugabe bei weiblichen MSCs

Die bisher durchgeführten Versuche zur Beeinflussbarkeit der chondrogenen Differenzierung von humanen MSCs durch  $17\beta$ -Estradiol erfolgten an mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark adulter männlicher Spender. Um die Auswirkung einer E2-Zugabe auf die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen adulter weiblicher Knochenmarkspenderinnen zu untersuchen, wurde analog zu Abschnitt 1.10.5  $17\beta$ -Estradiol in

den physiologischen Dosen E2  $10^{-8}$  M, E2  $10^{-9}$  M, E2  $10^{-10}$  M und E2  $10^{-11}$  M zugegeben.

Neben der Kontrollgruppe, die mit dem chondrogenen Basismedium (dex  $10^{-7}$  M) inkubiert wurde, wurden vier weitere Gruppen gebildet, die entweder mit E2  $10^{-8}$  M (Gruppe 2), E2  $10^{-9}$  M (Gruppe 3), E2  $10^{-10}$  M (Gruppe 4) oder E2  $10^{-11}$  M (Gruppe 5) behandelt wurden (vgl. Tabelle 6).

Dieser Versuch wurde mit hMSCs von acht weiblichen adulten Spenderinnen durchgeführt (n=8).

Gruppe	Zugabe Basis	Zugabe Speziell
1 (Kontrollgruppe)	dex $10^{-7}$ M	-
2	dex $10^{-7}$ M	E2 $10^{-8}$ M
3	dex $10^{-7}$ M	E2 $10^{-9}$ M
4	dex $10^{-7}$ M	E2 $10^{-10}$ M
5	dex $10^{-7}$ M	E2 $10^{-11}$ M

**Tabelle 6:** Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung einer E2-Zugabe zu weiblichen hMSCs

### 3.3 Makroskopie

Eine erste Auswertung erfolgte durch die makroskopische Beurteilung des Pelletwachstums. Die Größe der Pellets spiegelt das Ausmaß der Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten wieder. Hierfür wurden Zellaggregate an Tag 1, 7, 14 und 21 entnommen und unter dem Mikroskop mit einer Digitalkamera in 10-facher Vergrößerung fotografiert.

### 3.4 Histologische und immunologische Färbungen

Für die Histologie und Immunhistochemie wurden die Pellets jeweils nach einem 1-, 7-, 14- und 21-tägigen Differenzierungszeitraum entnommen. Das Potential und das Ausmaß der mesenchymalen Stammzellen, sich entlang der chondrogenen Linie zu hyalinem Knorpel zu differenzieren, wurde durch das Anfärben von sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) als Bestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix und der immunhistochemischen Detektion von Kollagen Typ II als spezifischen Knorpelmarker nachgewiesen.

### 3.4.1 Gewebeprevbereitung für histologische und immunologische Methoden

Die zu den unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Zellaggregate wurden unmittelbar nach der Entnahme für 45 Minuten in der Standardfixierungslösung mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Im Anschluss daran wurden sie 10 Minuten in Phosphatpuffer 0,1 M gespült, um dann in einer Saccharosereihe entwässert zu werden. Hierbei verweilten die Pellets jeweils für eine halbe Stunde in 10 %-iger sowie 20 %-iger Saccharose-Lösung und wurden schließlich in 30 %-iger Saccharose-Lösung bis zur Weiterverarbeitung bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

Zur Anfertigung der Gewebeschnitte wurden die Zellpellets blasenfrei in die carbowachshaltige Lösung Tissue Tek eingebettet, durch vorsichtiges Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und mit dem Microm HM 500 OM Kryostat in eine Dicke von 10–12 µm geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt, die mit Gelatine vorbeschichtet waren. Vor der jeweiligen Färbung wurden die Präparate mit Wasser gespült, damit die Reste des Tissue Tek entfernt wurden.

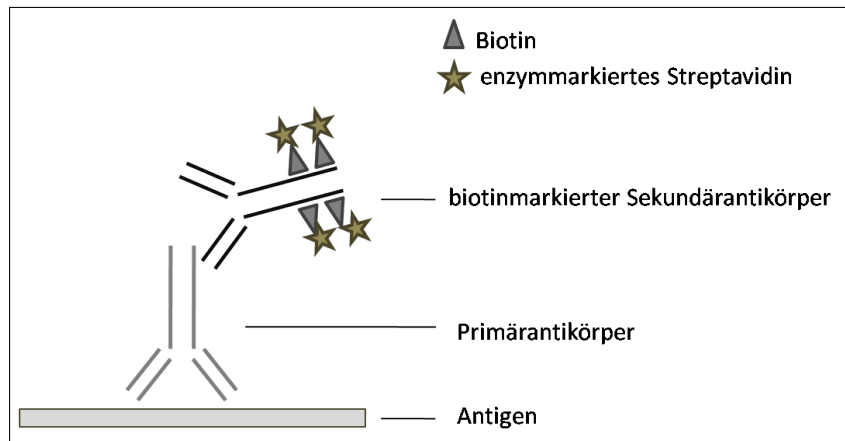
### 3.4.2 Histologische DMMB-Färbung

Zum qualitativen Nachweis der Bildung sulfatierter Glykosaminoglykane, die eine wichtige Komponente der extrazellulären Knorpelmatrix darstellen, wurden die Gewebepreparate mit einer 1,9-Dimethylmethylenblau-haltigen (DMMB) Lösung versetzt [151]. Durch die Inkubation mit diesem Farbstoff zeigen Zellaggregate mit sGAG-haltiger, extrazellulärer Matrix eine Metachromasie von einer blauen zu einer nun purpurfarbenen Anfärbung. Nach 4-5 Minuten Inkubation wurden die Präparate kurz mit Wasser gespült und über einer Isopropanolreihe entwässert. Hierbei verweilten sie eine Minute in 90 % Isopropanol, 2-mal 5 Minuten in 100 % Isopropanol und schließlich 2-mal 5 Minuten in 100 % Xylol. Die angefärbten Schnitte wurden mit DePex-Lösung luftdicht eingedeckt und zur späteren Digitalphotoauswertung trocken gelagert.

### 3.4.3 Immunhistochemische Kollagen Typ II-Detektion

Der Nachweis der Expression von Kollagen Typ II als spezifischen Marker für hyalinen Knorpel erfolgte über die immunhistochemische Färbung nach der von Hsu und seinen Kollegen 1981 entwickelten ABC-Methode (vgl. Abbildung 5). Dieses Verfahren stützt sich auf die starke Affinität des Proteins Streptavidin zum Vitamin Biotin. Der Primärantikörper richtet sich gegen das nachzuweisende Antigen und wird durch einen

biotinmarkierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, mit dem vorgeformten Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) verbunden. Die Detektion der Peroxidase erfolgt mit einem chromogenen Substrat, welches durch Oxidation in ein farbiges Reaktionsprodukt umgewandelt wird [152, 153].



**Abbildung 5:** Darstellung der ABC-Methode

### Durchführung

Zuerst wurde die endogene Peroxidase-Aktivität des Gewebes durch eine 30-minütige Inkubation im Peroxidase Blocking-Puffer blockiert. Dies ist wichtig für die Vermeidung von falsch-positiven Anfärbungen. Das Gewebe wurde dann für 15 Minuten mit der Pepsin-Andaulösung versetzt, die durch die Aktivität der proteolytischen Enzyme zu einer Demaskierung des Kollagen Typ II führt, und schließlich für eine Stunde im Blockingpuffer inkubiert. Der Blockingpuffer reduziert die Antikörperbindung an unspezifische Bindungsstellen. Zwischen jedem Arbeitsschritt wurden die Schnitte 3-mal für je 5 Minuten mit Waschpuffer gespült. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht, ohne die Schnitte nach der Inkubation im Blockingpuffer mit Waschpuffer gewaschen zu haben. Durch 3-maliges Spülen für 5 Minuten wurden am folgenden Tag überschüssige Primärantikörper entfernt und im Anschluss die Schnitte für 60 Minuten mit dem biotinmarkierten Sekundärantikörper inkubiert. Dann wurde der AB-Komplex für 60-90 Minuten zugegeben und anschließend die Peroxidaseaktivität mit der chromogenen DAB-Arbeitslösung detektiert. Vor den beiden zuletzt genannten Schritten erfolgte jeweils ein 3-mal 5-minütiges Spülen der Schnitte im Waschpuffer. Abschließend wurden die braunschwarz angefärbten Schnitte analog zu Abschnitt 3.4.2 in einer Isopropanolreihe entwässert und mit DePex-Lösung luftdicht eingedeckt.

Als Kontrolle der unspezifischen Anfärbung dienten Schnitte, bei denen die Zugabe des primären Antikörpers unterblieb. Für die Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Färbung enthielt jeder Schnitt ein Gewebestück, das sicher ein starkes Signal liefert.

### 3.5 Biochemische Analyseverfahren

Mit biochemischen Analyseverfahren war es möglich, einen quantitativen Nachweis bestimmter knorpelspezifischer Substrate zu erbringen. Der Gehalt des extrazellulären Knorpelbestandteils sGAG wurde mit dem DMMB-Assey und die Menge des spezifischen Knorpelmarkers Kollagen Typ II mit dem Native Type II Collagen Detection Kit bestimmt. Der DNA-Gehalt eines Knorpelzellaggregats wurde mit Hilfe des Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen dsDNA Kits 6009 gemessen und diente der Untersuchung des Proliferations- und Apoptoseverhaltens der Zellen während der Chondrogenese. Für die quantitativen Nachweismethoden wurden die Pellets nach dem gesamten Zeitraum der chondrogenen Differenzierung von 21 Tagen entnommen. Die Pellets wurden unmittelbar nach der Entnahme in Kryoröhrchen gefüllt, auf Eis überführt und bis zum Tag der Weiterverarbeitung im Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.5.1 Gewebeaufbereitung für biochemische Analyseverfahren

Am Tag der Weiterverarbeitung wurden die eingefrorenen Knorpelzellpellets bei RT aufgetaut. Der Verdau erfolgte nach dem Protokoll der Gewebeaufbereitung des Native Type II Collagen Detection Kits 6009 von Chondrex und schloss die differenzierten Knorpelpellets (Tag 21) und eine abgewogene Menge an Chondroitinsulfat A als Standard für den DMMB-Assey ein. Der Verdau bediente sich der Enzyme Pepsin und Elastase. Pepsin spaltet bei einem sauren pH von 2,9 – 3,0 die Telopeptide an den C- und N-terminalen Enden der Kollagenmoleküle ab und löst damit die Kollagenmoleküle aus den Kollagenfibrillen. Das pankreatische Enzym Elastase arbeitet bei einem pH von 8,0 und verdaut Kollagenmoleküle an ihren N-terminalen Enden, die die intra- und intermolekularen Quervernetzungen enthalten. Als Ergebnis der N-terminalen Abspaltung durch Elastase liegt Kollagen nun als monomeres Molekül vor.

#### Durchführung

Am ersten Verdautag wurde den Proben jeweils 200  $\mu\text{l}$  Essigsäure/NaCl-Lösung und 25  $\mu\text{l}$  Pepsin zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden unter ständigem Durchmischen im Rotator bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank. Am zweiten Tag wurden die angedauten Aggregate mit Hilfe des Homogenisators Xenox 40/E zerkleinert und nach der wiederholten Zuga-



be von gleichen Mengen an Essigsäure/NaCl-Lösung und Pepsin für weitere 24 Stunden rotierend im Kühlschrank inkubiert. Vor dem weiteren Verdau mit 50  $\mu$ l Elastase am dritten Tag, wurde durch die Zugabe von 50  $\mu$ l 10X TBS und vorsichtigem Anheben des pH-Wertes mit NaOH 1 N, eine Verdaulösung mit einem pH-Wert von 8,0 geschaffen. Das suspendierte Knorpelgewebe verdaute weitere 24 Stunden gekühlt im Rotator.

Nach Abschluss des Verdaus konnte direkt mit den quantitativen Bestimmungen begonnen werden. Erfolgt diese an einem anderen Tag, wurden die Proben im Gefrierfach bei -20° C gelagert und am Tag der Weiterverarbeitung bei RT aufgetaut.

Vor der Bestimmung des Gehalts von DNA, sGAG und Kollagen Typ II wurden die Proben bei 10000 U/Min und RT für 5 Minuten zentrifugiert, damit sich nicht verdautes Zellmaterial, wie beispielsweise Membranbestandteile, als Pellet absetzte. Die Probenentnahme erfolgte aus dem homogen getriebenen Überstand.

### 3.5.2 DNA-Bestimmung

Der DNA-Gehalt der Pellets wurde nach dem Protokoll des Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen dsDNA-Kits bestimmt.

Zunächst wurden die Proben im Verhältnis von 1 : 15 mit 1X TE-Puffer verdünnt. Mit Hilfe des Standards (sog. Lambda DNA Standard) wurde eine Verdünnungsreihe mit linear absteigenden Werten von 1  $\mu$ g/ml bis 0,0156  $\mu$ g/ml gebildet und daraus eine Standardkurve erstellt. Zur DNA-Detektion wurde das Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen dsDNA Reagent verwendet, welches direkt vor der Reaktion 200-fach mit 1X TE-Puffer verdünnt wurde. Zur Messung wurden je 100  $\mu$ l Probe bzw. Standard mit 100  $\mu$ l Reagenz in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vermischt. Alle Proben und Standards wurden dreifach pipettiert und vermessen. Als BLANK zur Hintergrundmessung wurde 1X TE-Puffer verwendet. Ein computerunterstütztes Fluorometer bestimmte die DNA-Konzentration bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm.

Anhand der Standardkurve konnten die DNA-Konzentrationen der einzelnen Proben ermittelt werden. Die Messwerte wurden in einer Excel-Mappe ausgegeben.

### 3.5.3 GAG-Bestimmung

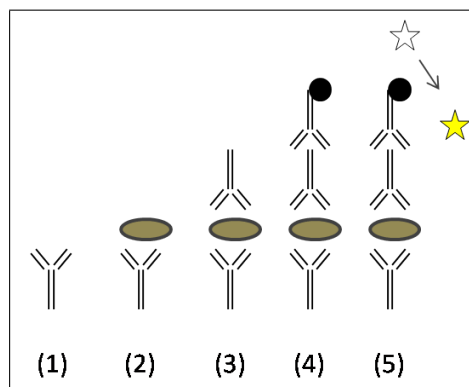
Der quantitative Anteil sulfatierter Glykosaminoglykane wurde mittels der 1,9-Dimethylenblauchlorid-Lösung (DMMB-Lösung) photometrisch detektiert [151]. Zur Erstellung der Standardkurve diente Chondroitinsulfat A in einer linearen Verdünnungsreihe von 40  $\mu$ g/ml bis 0,625  $\mu$ g/ml. Chondroitinsulfat A hat als Standard für die sGAG-

Bestimmung den gleichen 4-tägigen Verdau wie die Gewebeproben durchlaufen. Die Proben wurden mit dem DMMB Assay-Verdünnungspuffer in einem Verhältnis von 1 : 20 verdünnt. Für die Messung, die als Dreifachbestimmung erfolgte, wurden 50  $\mu$ l der Proben bzw. des Standards mit 200  $\mu$ l der DMMB-Lösung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vermischt. Als BLANK zur Hintergrundmessung wurde die Farbstofflösung verwendet. Der sGAG-Gehalt wurde durch die Bestimmung der Extinktion der einsetzenden Farb-reaktion bei 595 nm ermittelt.

Anhand der Standardkurve konnten die sGAG-Konzentrationen der einzelnen Proben ermittelt werden. Die Messwerte wurden in einer Excel-Mappe ausgegeben.

### 3.5.4 Kollagen Typ II-Bestimmung

Die Menge des spezifischen Knorpelmarkers Kollagen Typ II wurde mit dem Native Type II Collagen Detection Kit bestimmt, der nach dem Prinzip der Sandwich-ELISA-Technik arbeitet (vgl. Abbildung 6). Hierbei werden zwei Antikörper (Capture-Antikörper und Detektions-Antikörper) verwendet, die an unterschiedlichen Stellen spezifisch an das Antigen binden. Dadurch entstehen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Detektion und Quantifizierung des Antigens wird durch die Zugabe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers möglich, der an den Detektions-Antikörper bindet. Nach der Zugabe eines chromogenen Substrates, das durch das gekoppelte Enzym zu einem farbigen Reaktionsprodukt umgesetzt wird, kann das Antigen quantitativ gemessen werden. Die Signalstärke des Reaktionsproduktes ist dabei ein Maß für die Antigenkonzentration.



**Abbildung 6:** Prinzip Sandwich ELISA (1) Mit Capture-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte; (2) Zugabe der Probe bzw. des Antigens; (3) Zugabe des Detektions-Antikörpers; (4) Zugabe des Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers; (5) Zugabe eines zum Enzym passenden Substrates, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

### Durchführung

Als Vorbereitung wurde am Tag vor der Kollagen Typ II-Bestimmung eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit je 100  $\mu\text{l}$  der Lösung, die den Capture-Antikörper enthält, befüllt und über Nacht bei 4° C im Kühlschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Gewebeproben in einem Verhältnis von 1 : 15 und zur Erstellung einer Standardkurve der Kollagen Typ II-Standard in einer linearen Verdünnungsreihe von 0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis 0,003  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt. Nachdem nicht anhaftende Capture-Antikörper durch Auswaschen der Platte mit Waschpuffer entfernt wurden, wurden die Proben bzw. Standards jeweils dreimal pipettiert (100  $\mu\text{l}$ ) und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Durch das anschließende Waschen der Platte wurden ungebundene Bestandteile der Probe bzw. des Standards entfernt. Als nächstes wurden 100  $\mu\text{l}$  des Detektions-Antikörpers bei RT für 2 Stunden zugegeben, so dass sich Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe bildeten. Überschüssige Antikörper wurden durch erneutes Waschen der Platte entfernt. Für die Detektion wurde die Platte mit je 100  $\mu\text{l}$  Streptavidin-Peroxidase-Lösung befüllt, für 1 Stunde bei RT inkubiert und dann mit Waschpuffer gewaschen. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  des chromogenen Substrates OPD-Urea  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches von der Streptavidin-Peroxidase zu einem optisch messbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wurde. Die Messung erfolgte nach 15-minütiger Inkubation und Abbrechen der Reaktion mittels der Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Schwefelsäure 2N bei 490 nm. Als BLANK zur Hintergrundmessung wurde die Streptavidin-Peroxidase-Lösung verwendet.

Anhand der Standardkurve konnten die Kollagen Typ II-Konzentrationen der einzelnen Proben ermittelt werden. Die Messwerte wurden in einer Excel-Mappe ausgegeben.

### 3.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SigmaStat 32 für Windows erstellt. Unterschiede wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,01$  als hoch signifikant und mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,001$  als höchst signifikant bewertet.

Da die Syntheseleistung eines Pellets von seiner genauen Zellzahl abhängt, konnten die durch die biochemischen Analyseverfahren gewonnenen absoluten sGAG- und Kollagen Typ II-Werte nicht direkt miteinander verglichen werden. Es wurde daher der Quotient zur jeweils detektierten DNA-Konzentration (sGAG/DNA bzw. Kollagen Typ II/DNA) gebildet. Jedoch auch die so erhaltenen Werte wiesen unter den herangezögten MSCs verschiedener Knochenmarkspender eine solche Schwankungsbreite auf, dass für die statistische Auswertung eine weitere Transformation der Werte erfolgte. Hierbei wurde die

Syntheseleistung der Pellets, die von MSCs eines Spenders abstammten, als Prozent auf die 100 % Syntheseleistung der Kontrollgruppe (dex-Gruppe) bezogen.

Es war zu untersuchen, ob sich in der biochemischen Auswertung unter der jeweiligen Einflussgröße (Zugabe eines potentiell die Chondrogenese beeinflussenden Faktors) im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikante Unterschiede ergaben. Da es sich dabei um zwei unabhängige, nicht-normalverteilte Gruppen handelte, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) verwendet. Dies ist ein parameterfreier statistischer Test, der in Form einer Rangordnung die Verteilung der Kontrollgruppe mit der Verteilung der unter dem spezifischen Einflussfaktor stehenden Vergleichsgruppe auf Signifikanz hin bewertet.

Die graphische Darstellung erfolgte mit der Tabellensoftware SigmaPlot 10.0 für Windows. Die Werte wurden jeweils als % der Kontrolle  $[(\mu\text{g/ml})/(\mu\text{g/ml})]$  dargestellt. Jede Einzelmessung erfolgte als Dreifachbestimmung, der Mittelwert dieser wurde als Maßzahl der mittleren Lage durch einen Punkt in der graphischen Darstellung abgebildet. Die dargestellten Einzelwerte wurden von Boxplots ergänzt, die sich besonders gut für die Darstellung nicht normalverteilter Werte, wie im Falle dieser Arbeit, eignen. Boxplots geben mit Hilfe des Medians sowie des oberen und unteren Quartils (sog. 75. und 25. Perzentile) einen guten Überblick über die Lage und Streuungen der Werte innerhalb einer gleich behandelten Gruppe. Zusätzlich wurde die Standardabweichung als Maßzahl der Streuung eingetragen.

## 4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Einzelversuche durchgeführt, in denen der Einfluss von  $17\beta$ -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung humaner MSCs genauer untersucht wurde. Die Ergebnisse umfassen die Beurteilung der Makroskopie, die histologische Anfärbung sulfatierter Glykosaminoglykane, die immunhistochemische Detektion von Kollagen Typ II und die biochemische Bestimmung des sGAG-, Kollagen Typ II- und DNA-Gehaltes. Eine Übersicht der statistischen Ergebnisse aus der biochemischen Auswertung befindet sich im Anhang (vgl. Abschnitt 8.4).

### 4.1 Wirkung von $17\beta$ -Estradiol

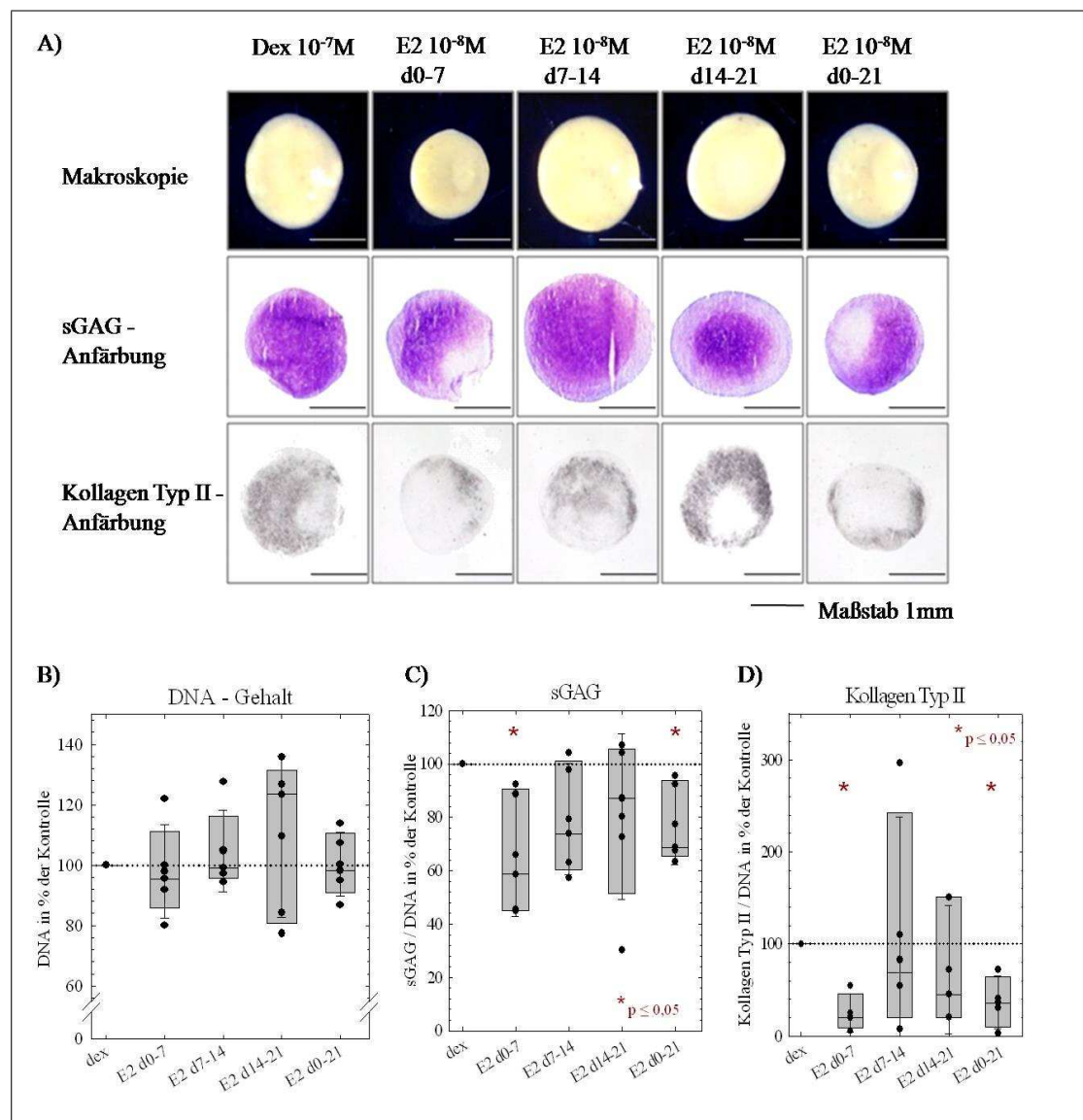
Die Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol während der chondrogenen Differenzierung von humanen MSCs führte in Vorarbeiten bei der Konzentration  $10^{-8}$  M zu einer signifikanten Hemmung der Ablagerung extrazellulärer Matrixbestandteile (sGAG und Kollagen Typ II). In diesem Versuchsteil wurde untersucht, ob die hemmende Wirkung von E2 im gesamten Zeitraum der 21-tägigen Differenzierungsphase erfolgt. E2 ( $10^{-8}$  M) wurde hierfür sequenziell in definierten Zeiträumen zugegeben (Tag 0-7, Tag 7-14, Tag 14-21 und Tag 0-21). Damit konnten E2-sensitive Phasen identifiziert werden, in denen die Hemmung der Chondrogenese erfolgt.

Bei der makroskopischen Beurteilung war zu sehen, dass Pellets, die in der Anfangsphase der chondrogenen Differenzierung (Tag 0-7 und Tag 0-21) einer E2-Zugabe ausgesetzt waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe und den weiteren Versuchsgruppen (E2 von Tag 7-14 und Tag 14-21) kleiner waren (vgl. Abbildung 7 A), erste Reihe). Diese Tendenz zeigte sich auch bei der histologischen Anfärbung sulfatierter Glykosaminoglykane und dem immunhistochemischen Nachweis des hyalinen Knorpelmarkers Kollagen Typ II (vgl. Abbildung 7 A), zweite und dritte Reihe): Es wiesen diejenigen Schnitte eine schwächere und unregelmäßigere Metachromasie des Farbstoffes 1,9-Dimethylmethylenblau und eine geringere Kollagen Typ II-Detektion auf, die von Tag 0 bis 7 und von Tag 0 bis 21 dem Hormon  $17\beta$ -Estradiol ausgesetzt waren.

Die biochemische Analyse bestätigte, dass die Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix signifikant vermindert wurde, sobald  $17\beta$ -Estradiol in frühen Differenzierungsstadien zugegeben wurde (vgl. Abbildung 7 C) und D)). Bei der von Tag 0 bis 7 mit E2 behandelten Gruppe war die Bildung von sGAG ( $p = 0,016$ ) und Kollagen Typ II ( $p = 0,029$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Eine ebenso signifikante Hemmung der Synthese von sGAG ( $p = 0,016$ ) und Kollagen Typ II ( $p = 0,029$ )

wurde bei der Gruppe an Pellets beobachtet, die den gesamten 21-tägigen Differenzierungszeitraum (Tag 0-21) mit  $17\beta$ -Estradiol inkubiert wurde. Eine E2-Zugabe zu späteren Differenzierungszeitpunkten führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Chondrogenese (E2 von Tag 7-14: sGAG mit  $p = 0,190$  und Kollagen Typ II mit  $p = 0,730$ ; E2 von Tag 14-21: sGAG mit  $p = 0,343$  und Kollagen Typ II mit  $p = 0,629$ ).

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes ergab für die Versuchsgruppen im Vergleich mit der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied (E2 von Tag 0-7:  $p = 0,190$ ; E2 von Tag 7-14:  $p = 0,730$ ; E2 von Tag 14-21:  $p = 0,730$ ; E2 von Tag 0-21:  $p = 0,730$ ) (vgl. Abbildung 7 B)).  $17\beta$ -Estradiol hatte in keinem der sequenziellen Zeiträume eine Auswirkung auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der Zellaggregate.



**Abbildung 7:** Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol. Die E2-Zugabe ( $10^{-8}$  M) erfolgte in verschiedenen Zeiträumen (Tag 0-7, Tag 7-14, Tag 14-21 und Tag 0-21). A) Darstellung der Makroskopie, sGAG-Anfärbung (1,9-Dimethylmethylenblau-Färbung) und immunhistochemischen Kollagen Typ II-Detektion der Aggregate an Tag 21. Maßstab 1 mm. B) Biochemische Bestimmung des DNA-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=5). C) Biochemische Bestimmung des Kollagen Typ II-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=5). D) Biochemische Bestimmung des sGAG-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=5). B), C) und D): Die graphische Darstellung der Boxplots mit Median wird durch die Mittelwerte der Einzelmessungen (Punkte) und die Standardabweichung ergänzt. Die Werte sind jeweils in % der Kontrolle  $[(\mu\text{g/ml})/(\mu\text{g/ml})]$  abgebildet. Die Kontrolle (dex) stellt die gepunktete Linie bei 100 % dar. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe werden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant gewertet.

## 4.2 Wirkung von E2-BSA

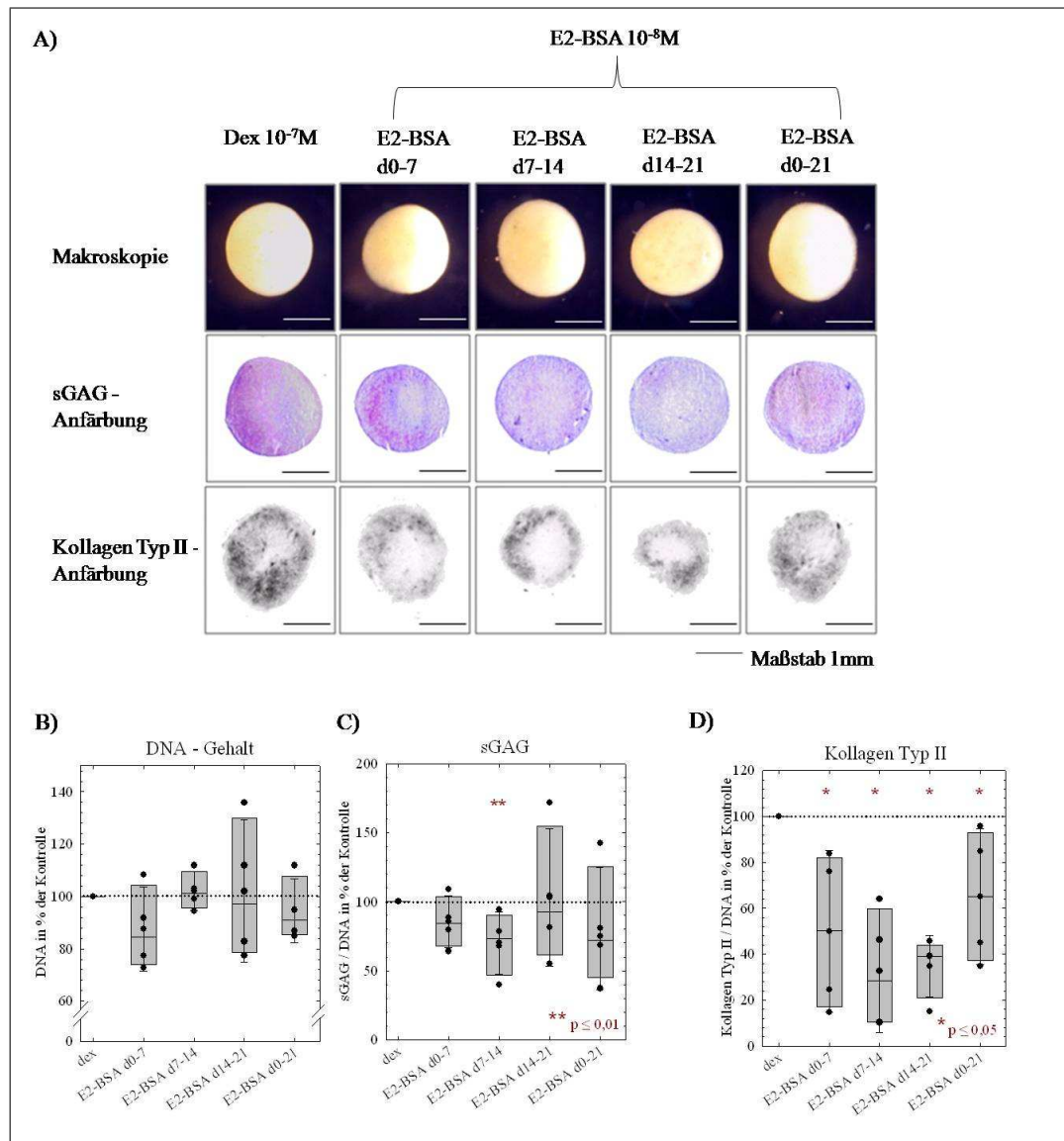
Durch die Verwendung von an BSA konjugiertem  $17\beta$ -Estradiol (E2-BSA) wurde gezielt untersucht, welche Rolle die membranvermittelten, nicht-klassischen Wirkungswege an der Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung der humanen MSCs spielen. E2-BSA ( $10^{-8}$  M) wurde analog zum vorherigen Versuchsteil (vgl. Abschnitt 4.1) in klar definierten Zeiträumen zugegeben, von Tag 0 bis 7, Tag 7 bis 14, Tag 14 bis 21 und Tag 0 bis 21. Damit wurde bewertet, ob sich während des Differenzierungsprozesses bestimmte Phasen identifizieren lassen, in welchen eine E2-BSA-Zugabe die Chondrogenese beeinflusst.

Makroskopisch konnte zwischen den Aggregaten, die mit E2-BSA in einem der definierten Zeiträume (Tag 0-7, Tag 7-14, Tag 14-21 und Tag 0-21) inkubiert wurden, und der Kontrollgruppe kein Unterschied in der Größe detektiert werden (vgl. Abbildung 8 A, erste Reihe). Bei der histologischen Anfärbung sulfatierter Glykosaminoglykane zeigten jedoch alle Versuchsgruppen (E2-BSA von Tag 0-7, Tag 7-14, Tag 14-21 und Tag 0-21) eine im Vergleich zur Kontrolle schwächere und unregelmäßigere Metachromasie (vgl. Abbildung 8 A), zweite Reihe). Kollagen Typ II war immunhistochemisch im Vergleich zur Kontrolle ebenso in allen mit E2-BSA behandelten Gruppen nur gering detektierbar (vgl. Abbildung 8 A), dritte Reihe).

Diese Beobachtung konnte bei der biochemischen Bestimmung der Kollagen Typ II-Konzentration weiter bekräftigt werden (vgl. Abbildung 8 D)): In jedem der definierten Zeiträume (Tag 0-7, Tag 7-14, Tag 14-21 und Tag 0-21) führte die Zugabe von E2-BSA zu einer signifikant verminderten Synthese von Kollagen Typ II (jeweils  $p = 0,029$ ). Bei den Aggregaten, die von Tag 7 bis 14 mit E2-BSA inkubiert wurden, wurde zusätzlich eine hoch signifikant verminderte Ablagerung von sGAG ( $p = 0,010$ ) nachgewiesen (vgl. Abbildung 8 C)). Für die Inkubation der Zellaggregate mit E2-BSA in den anderen Zeiträumen (Tag 0-7, Tag 14-21 und Tag 0-21) ergab sich bei der biochemischen Bestimmung des sGAG-Gehalts kein signifikantes Ergebnis (E2-BSA von Tag 0-7:  $p = 0,257$ ; E2-BSA von Tag 14-21:  $p = 1,000$ ; E2-BSA von Tag 0-21:  $p = 0,257$ ).

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes ergab im Vergleich der mit E2-BSA inkubierten Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied (E2 von Tag 0-7:  $p = 0,343$ ; E2 von Tag 7-14:  $p = 1,000$ ; E2 von Tag 14-21:  $p = 1,000$ ; E2 von Tag 0-21:  $p = 0,343$ ) (vgl. Abbildung 8 B)). Das membranimpermeable Konjugat E2-BSA hatte in keinem der definierten Zeiträume eine Auswirkung auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der Zellaggregate.





**Abbildung 8:** Wirkung von E2-BSA. Die E2-BSA-Zugabe ( $10^{-8}$  M) erfolgte in verschiedenen Zeiträumen (Tag 0-7, Tag 7-14, Tag 14-21 und Tag 0-21). A) Darstellung der Makroskopie, sGAG-Anfärbung (1,9-Dimethylmethylenblau-Färbung) und immunhistochemischen Kollagen Typ II-Detektion der Aggregate an Tag 21. Maßstab 1 mm. B) Biochemische Bestimmung des DNA-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=4). C) Biochemische Bestimmung des Kollagen Typ II-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=4). D) Biochemische Bestimmung des sGAG-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=4). B),C) und D): Die graphische Darstellung der Boxplots mit Median wird durch die Mittelwerte der Einzelmessungen (Punkte) und die Standardabweichung ergänzt. Die Werte sind jeweils in % der Kontrolle  $[(\mu\text{g/ml})/(\mu\text{g/ml})]$  abgebildet. Die Kontrolle (dex) stellt die gepunktete Linie bei 100 % dar. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe werden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant und mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,01$  als hoch signifikant gewertet.

### 4.3 Nicht-klassische Estrogenwirkung über GPR30

GPR30 ist ein spezifischer membranständiger  $17\beta$ -Estradiol-Rezeptor. Seine Beteiligung an der Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen wurde in diesem Versuchsteil gezielt untersucht. Hierfür wurde neben  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-8}$  M), an BSA gekoppeltes E2 ( $10^{-8}$  M), ICI 182.780 ( $10^{-8}$  M) in seiner Rolle als GPR30-Agonist und G-1 ( $10^{-8}$  M) als selektiver GPR30-Agonist während des gesamten 21-tägigen Differenzierungsprozesses hinzugegeben.

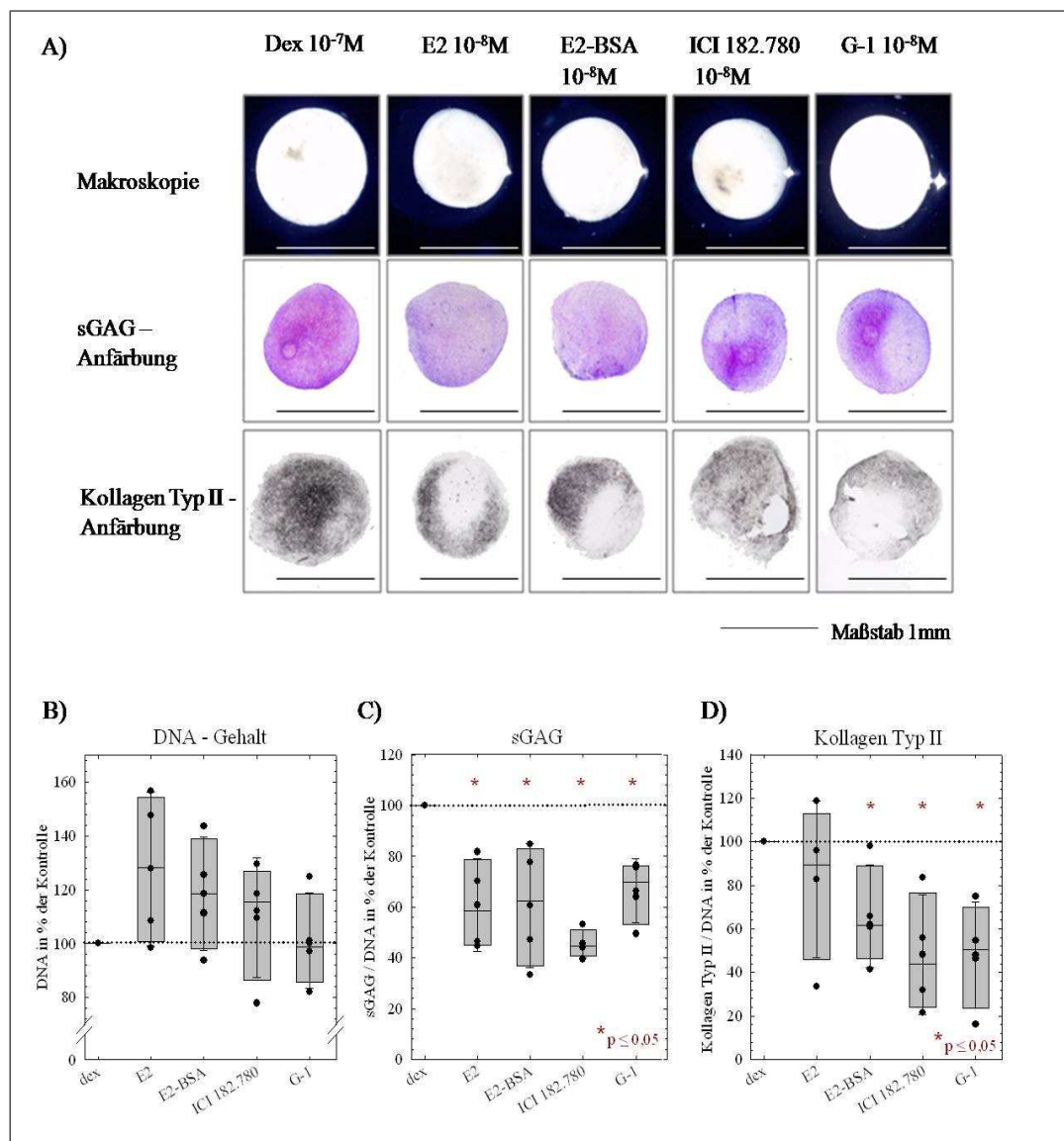
Bei allen Versuchsgruppen (E2, E2-BSA, ICI 182.780 und G-1) zeigte die makroskopische Betrachtung leicht verkleinerte Aggregate (vgl. Abbildung 9 A), erste Reihe) im Vergleich zur Kontrolle. Auch das histologische und immunhistochemische Färbeverhalten der Zellaggregate war abgeschwächt (vgl. Abbildung 9 A), zweite und dritte Reihe): Die Pellets, die mit E2, E2-BSA, ICI 182.780 oder G-1 inkubiert wurden, bildeten im Vergleich zur Kontrolle weniger und unregelmäßiger die strukturellen Matrixbestandteile sGAG und Kollagen Typ II.

Das membranimpermeable Konjugat E2-BSA zeigte somit bei der histologischen und immunhistochemischen Anfärbung analog zu den Ergebnissen des vorherigen Versuchs (vgl. Abschnitt 4.2) eine verminderte Ablagerung von sulfatierten Glykosaminoglykanen und Kollagen Typ II. Bei der biochemischen Analyse wurde für E2-BSA bei der Bestimmung der sGAG-Konzentration ( $p = 0,029$ ) und der Kollagen Typ II-Detektion ( $p = 0,029$ ) ein signifikantes Ergebnis als Ausdruck verminderter extrazellulärer Ablagerung gemessen (vgl. Abbildung 9 C) und D)).

Die mit ICI 182.780 behandelte Zellkultur zeigte makroskopisch im Vergleich zur Kontrollgruppe verkleinerte Zellaggregate, die histologisch und immunhistochemisch eine verminderte Anfärbbarkeit der extrazellulären Matrixbestandteile sGAG und Kollagen Typ II aufwiesen. Bei den biochemischen Analyseverfahren ergaben sich signifikant verminderte sGAG ( $p = 0,029$ ) - und Kollagen Typ II ( $p = 0,029$ ) -Konzentrationen (vgl. Abbildung 9 C) und D)).

Durch die Verwendung des spezifischen GPR30-Agonisten G-1 konnte gezielt die Beteiligung des nicht-klassischen Estrogenrezeptors GPR30 an der Beeinflussung der Chondrogenese humaner MSCs untersucht werden. Die mit G-1 inkubierten Aggregate zeigten ähnlich der mit E2 behandelten Gruppe eine verminderte makroskopische Größe und ein abgeschwächtes Färbeverhalten bei der sGAG- und Kollagen Typ II-Anfärbung. Die quantitative Detektion des sGAG ( $p = 0,029$ ) - und Kollagen Typ II ( $p = 0,029$ ) -Gehalts zeigte im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringere Konzentrationen (vgl. Abbildung 9 C) und D)).

Der DNA-Gehalt der Pellets wurde während der Differenzierungsphase durch die Zugabe von E2, E2-BSA, ICI 182,780 und G-1 nicht beeinflusst (E2:  $p = 0,343$ ; E2-BSA:  $p = 0,343$ ; ICI 182.780:  $p = 0,343$ ; G-1:  $p = 1,000$ ) (vgl. Abbildung 9 B)). Keiner dieser Faktoren hatte während der Chondrogenese eine Auswirkung auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der Zellaggregate.



**Abbildung 9:** Nicht-klassische Estrogenwirkung. Um die Beteiligung des membranständigen ER GPR30 zu untersuchen, erfolgte die Zugabe von E2 ( $10^{-8}$  M), E2-BSA ( $10^{-8}$  M), ICI 182.780 ( $10^{-8}$  M) und G-1 ( $10^{-8}$  M). A) Darstellung der Makroskopie, sGAG-Anfärbung (1,9-Dimethylmethylenblau-Färbung) und immunhistochemischen Kollagen Typ II-Detektion der Aggregate an Tag 21. Maßstab 1 mm. B) Biochemische Bestimmung des DNA-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=4). C) Biochemische Bestimmung des Kollagen Typ II-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=4). D) Biochemische Bestimmung des sGAG-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=4). B), C) und D): Die graphische Darstellung der Boxplots mit Median wird durch die Mittelwerte der Einzelmessungen (Punkte) und die Standardabweichung ergänzt. Die Werte sind jeweils in % der Kontrolle  $[(\mu\text{g/ml})/(\mu\text{g/ml})]$  abgebildet. Die Kontrolle (dex) stellt die gepunktete Linie bei 100 % dar. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe werden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant gewertet.

#### 4.4 Blockierung der nicht-klassischen Estrogenwirkung über GPR30

G15 wurde verwendet, um die Rolle von GPR30 an der hemmenden Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung der humanen MSCs abschließend zu analysieren. Die Versuchsgruppen wurden während der 21-tägigen chondrogenen Differenzierung jeweils mit E2 ( $10^{-8}$  M), G-1 ( $10^{-8}$  M) und G15 ( $10^{-8}$  M) allein sowie mit der Koinkubation aus E2 und G15 (E2+G15) sowie G-1 und G15 (G-1+G15) behandelt.

Die Zugabe von G15 allein führte zu keiner Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung der hMSCs: Die Aggregate wiesen im Vergleich zur Kontrolle makroskopisch eine gleiche Größe auf und es gelang eine ausgeprägte histologische bzw. immunhistochemische Anfärbung von sulfatierten Glykosaminoglykanen und Kollagen Typ II (vgl. Abbildung 10 A)). Bei der biochemischen Analyse fand durch G15 keine signifikante, quantitative Beeinflussung der Produktion der strukturellen Matrixbestandteilen sGAG ( $p = 0,214$ ) und Kollagen Typ II ( $p = 1,000$ ) statt (vgl. Abbildung 10 C) und D)).

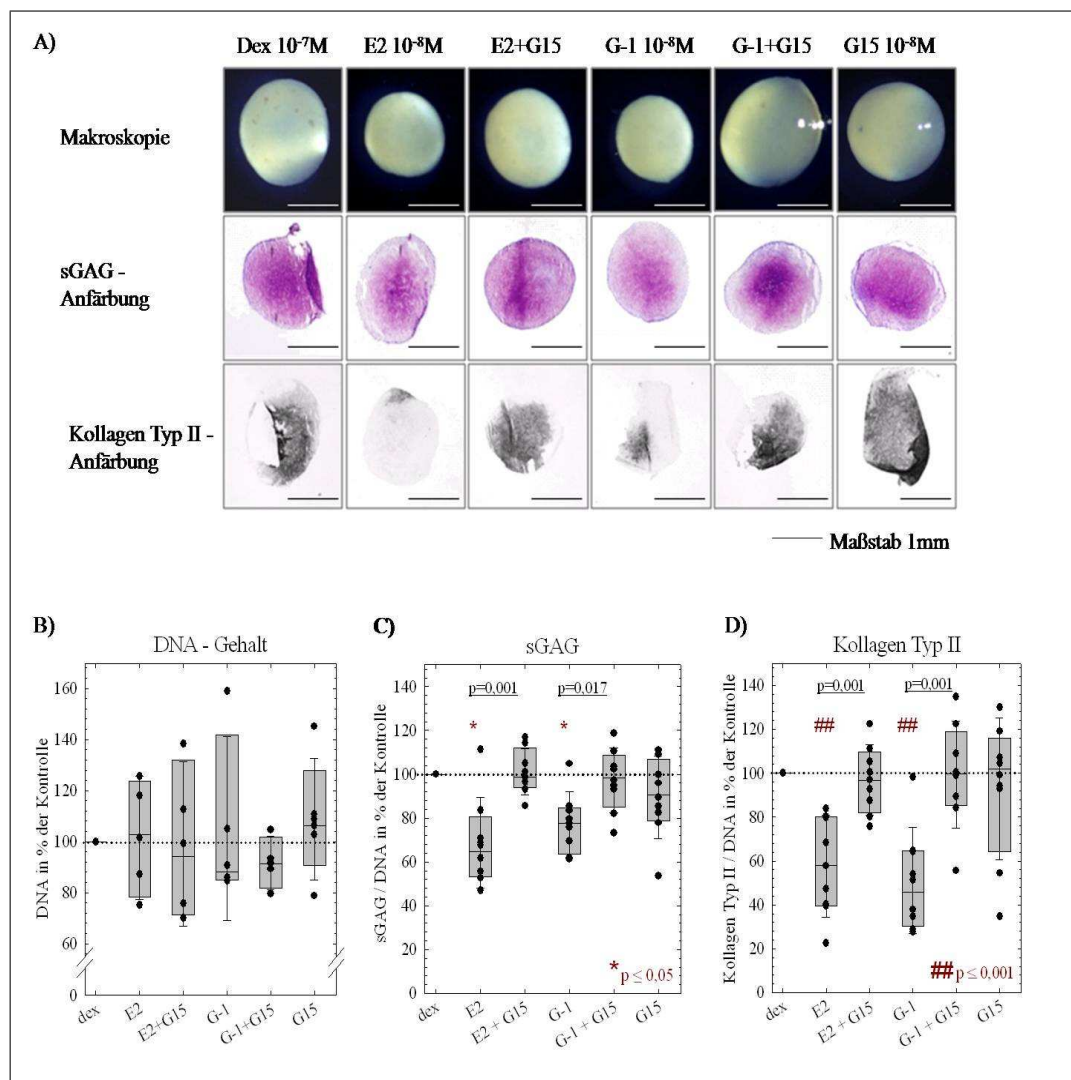
Die Inkubation der Pellets mit den Faktoren E2 bzw. G-1 allein führte als Zeichen einer unterdrückten chondrogenen Differenzierung der hMSCs zu einer verminderten Bildung von strukturellen Knorpelbestandteilen: Neben verkleinerten Zellaggregaten, einer schwächeren histologischen sGAG-Anfärbung und einem geringeren immunhistochemischen Kollagen Typ II-Nachweis (vgl. Abbildung 10 A)), wurde ein signifikant niedriger sGAG-Gehalt (E2:  $p = 0,048$ ; G-1:  $p = 0,048$ ) und eine höchst signifikant niedrigere Kollagen Typ II-Konzentration (E2:  $p = 0,001$ ; G-1:  $p = 0,001$ ) gemessen (vgl. Abbildung 10 C) und D)).

Durch die Koinkubation von E2 und G15 bzw. G-1 und G15 kam es zu einer Blockierung der nicht-klassischen estrogenen Effekte über GPR30: Die Aggregate, die mit E2 und G15 bzw. G-1 und G15 koinkubiert wurden, wiesen bei der makroskopischen Betrachtung eine ähnliche Größe wie die Kontrollgruppe auf (vgl. Abbildung 10 A), erste Reihe). Auch waren die extrazellulären Knorpelbestandteile sGAG und Kollagen Typ II deutlich stärker histologisch und immunhistochemisch anfärbbar (vgl. Abbildung 10 A), zweite und dritte Reihe). Die biochemische Analyse zeigte, dass es sowohl bei einer Koinkubation der Pellets mit E2 und G15 (E2+G15 mit sGAG:  $p = 0,570$  und Kollagen Typ II:  $p = 1,000$ ) als auch bei einer Koinkubation von G-1 und G15 (G-1+G15 mit sGAG:  $p = 1,000$  und Kollagen Typ II:  $p = 1,000$ ) zu keiner signifikanten Einschränkung der Bildung der extrazellulären Matrixbestandteile sGAG und Kollagen Typ II gekommen ist (vgl. Abbildung 10 C) und D)).

Weiter konnte die verminderte Ablagerung der extrazellulären Knorpelmatrix sGAG und Kollagen Typ II, die durch die alleinige Inkubation der Aggregate mit sowohl E2 als auch

G-1 ausgelöst wurde, durch die jeweilige Koinkubation mit G15 signifikant bzw. höchst signifikant aufgehoben werden (vergleiche Zugabe E2 allein mit Koinkubation E2+G15: sGAG  $p = 0,001$  und Kollagen Typ II  $p = 0,001$ ; vergleiche Zugabe G-1 allein mit Koinkubation G-1+G15: sGAG  $p = 0,017$  und Kollagen Typ II  $p = 0,001$ )(vgl. Abbildung 10 C) und D)).

Der DNA-Gehalt der Pellets wurde während der Differenzierungsphase durch die Zugabe von E2, G-1, G15, E2+G15 und G-1+G15 nicht beeinflusst (E2:  $p = 1,000$ ; E2 + G15:  $p = 1,000$ ; G-1:  $p = 0,343$ ; G-1 + G15:  $p = 0,164$ ; G15:  $p = 0,190$ ) (vgl. Abbildung 10 B)). Keiner dieser Faktoren hatte allein oder in Kombination eine Auswirkung auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der Zellaggregate.



**Abbildung 10:** Blockierung der nicht-klassischen Estrogenwirkung. Die nicht-klassischen Estrogeneffekte, die über den membranständigen Rezeptor GPR30 vermittelt wurden, wurden mit G15 blockiert. Es erfolgte eine Zugabe von E2 ( $10^{-8}$  M), E2+G15 (je  $10^{-8}$  M), G-1 ( $10^{-8}$  M), G-1+G15 (je  $10^{-8}$  M) und G15 ( $10^{-8}$  M). A) Darstellung der Makroskopie, sGAG-Anfärbung (1,9-Dimethylmethylenblau-Färbung) und immunhistochemischen Kollagen Typ II-Detektion der Aggregate an Tag 21. Maßstab 1 mm. B) Biochemische Bestimmung des DNA-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=4). C) Biochemische Bestimmung des Kollagen Typ II-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=8). D) Biochemische Bestimmung des sGAG-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=8). B), C) und D): Die graphische Darstellung der Boxplots mit Median wird durch die Mittelwerte der Einzelmessungen (Punkte) und die Standardabweichung ergänzt. Die Werte sind jeweils in % der Kontrolle  $[(\mu\text{g/ml})/(\mu\text{g/ml})]$  abgebildet. Die Kontrolle (dex) stellt die gepunktete Linie bei 100 % dar. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe werden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant und mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,001$  als höchst signifikant gewertet.

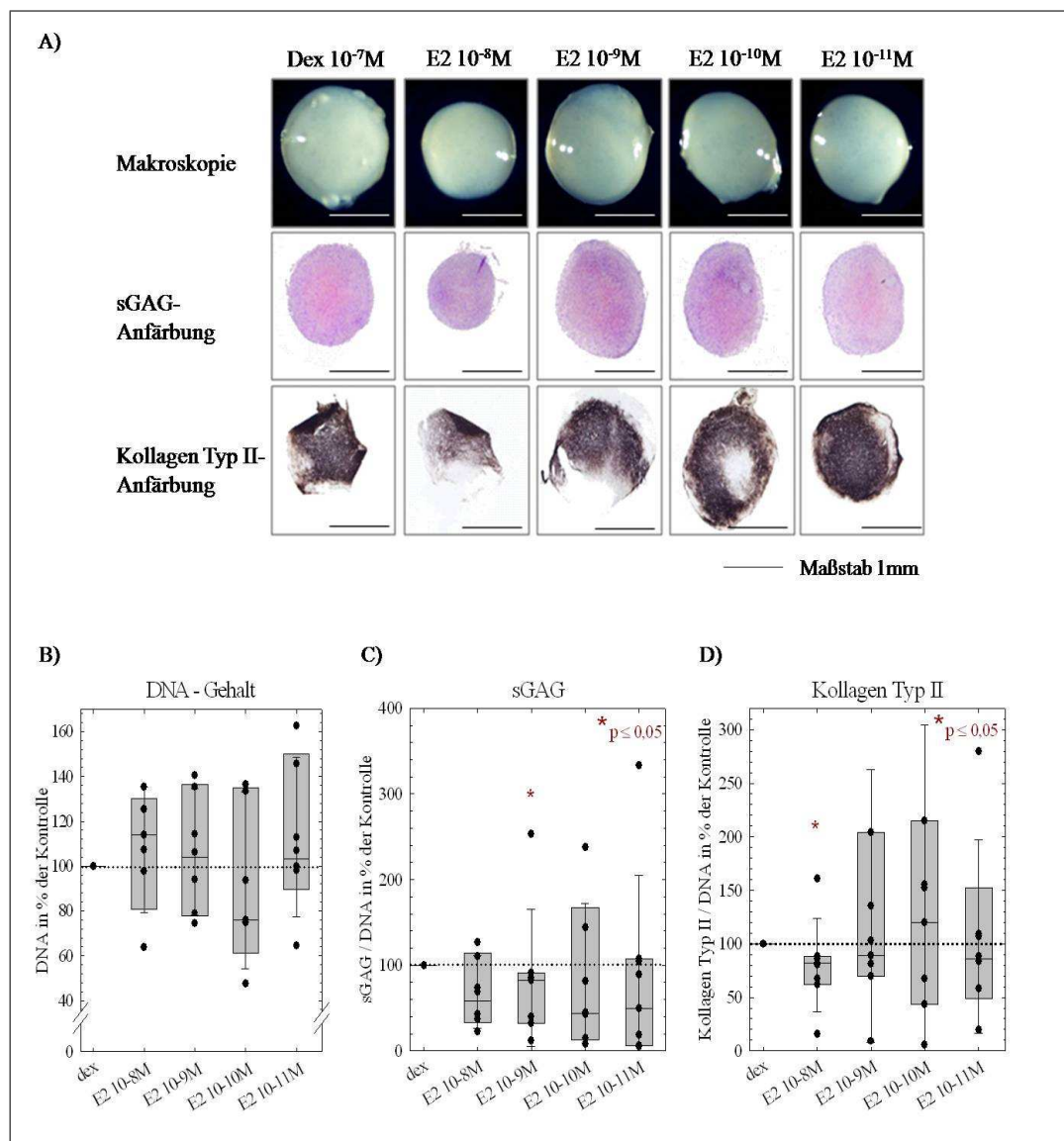
#### 4.5 Wirkung von Estrogen bei weiblichen hMSCs

In diesem Teil wurde der Einfluss von  $17\beta$ -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen von adulten weiblichen Spenderinnen untersucht. Dazu wurde E2 zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung in den vier unterschiedlichen physiologischen Konzentrationen - E2  $10^{-8}$  M, E2  $10^{-9}$  M, E2  $10^{-10}$  M und E2  $10^{-11}$  M - zugegeben.

Bei der makroskopischen Beurteilung waren die Pellets, die mit E2  $10^{-8}$  M, E2  $10^{-10}$  M und E2  $10^{-11}$  M behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe und den mit E2  $10^{-9}$  M inkubierten Zellaggregaten kleiner (vgl. Abbildung 11 A), erste Reihe). Bei der histologischen Anfärbung sulfatierter Glykosaminoglykane zeigte sich bei den Zellaggregaten, die mit E2  $10^{-8}$  M und E2  $10^{-11}$  M inkubiert wurden, eine schwächere Metachromasie (vgl. Abbildung 11 A), zweite Reihe). Der immunhistochemische Kollagen Typ II - Nachweis führte in der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen, die mit E2 in den Konzentrationen  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M und  $10^{-11}$  M behandelt wurden, zu stark angefärbten, kollagenreichen Schnitten. Bei den Aggregaten, die mit E2  $10^{-8}$  M inkubiert wurden, war die Kollagen Typ II-Anfärbung dagegen unregelmäßig und schwach (vgl. Abbildung 11 A), dritte Reihe).

Die quantitative Analyse ergab eine signifikant verminderte Ablagerung von sGAG ( $p = 0,021$ ) bei der Zugabe von E2 in der Konzentration  $10^{-9}$  M. Die Inkubation der Pellets mit  $17\beta$ -Estradiol in einer der anderen Konzentrationen (E2  $10^{-8}$  M, E2  $10^{-10}$  M und E2  $10^{-11}$  M) beeinträchtigte die sGAG-Produktion dagegen nicht signifikant (E2  $10^{-8}$  M:  $p = 0,343$ ; E2  $10^{-10}$  M:  $p = 0,343$ ; E2  $10^{-11}$  M:  $p = 0,694$ ) (vgl. Abbildung 11 C)). Der Kollagen Typ II-Gehalt war bei der Versuchsgruppe, die mit E2  $10^{-8}$  M ( $p = 0,021$ ) behandelt wurde, signifikant vermindert. Eine E2-Zugabe in den Konzentrationen  $10^{-9}$  M ( $p = 0,189$ ),  $10^{-10}$  M ( $p = 1,000$ ) und  $10^{-11}$  M ( $p = 0,345$ ) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Ablagerung des Knorpelproteins Kollagen Typ II (vgl. Abbildung 11 D)). Der DNA-Gehalt der Pellets wurde während der Differenzierungsphase durch  $17\beta$ -Estradiol nicht beeinflusst (E2  $10^{-8}$  M:  $p = 0,662$ ; E2  $10^{-9}$  M:  $p = 1,000$ ; E2  $10^{-10}$  M:  $p = 0,662$ ; E2  $10^{-11}$  M:  $p = 1,000$ ) (vgl. Abbildung 11 B)). E2 hatte in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten der chondrogen differenzierenden, humanen MSCs der weiblichen Spenderinnen.





**Abbildung 11:** Wirkung von Estrogen bei weiblichen hMSCs. Die Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol erfolgte in verschiedenen Konzentrationen (E2  $10^{-8}$  M, E2  $10^{-9}$  M, E2  $10^{-10}$  M und E2  $10^{-11}$  M). A) Darstellung der Makroskopie, sGAG-Anfärbung (1,9-Dimethylmethylenblau-Färbung) und immunhistochemischen Kollagen Typ II-Detektion der Aggregate an Tag 21. Maßstab 1 mm. B) Biochemische Bestimmung des DNA-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=8). C) Biochemische Bestimmung des Kollagen Typ II-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=8). D) Biochemische Bestimmung des sGAG-Gehalts der Aggregate an Tag 21 (n=8). B), C) und D): Die graphische Darstellung der Boxplots mit Median wird durch die Mittelwerte der Einzelmessungen (Punkte) und die Standardabweichung ergänzt. Die Werte sind jeweils in % der Kontrolle [ $(\mu\text{g/ml})/(\mu\text{g/ml})$ ] abgebildet. Die Kontrolle (dex) stellt die gepunktete Linie bei 100 % dar. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe werden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant gewertet.

## 5 Diskussion

In der Regenerativen Medizin erhofft man sich bei der Reparatur von Gelenkknorpeldefekten durch die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen große Erfolge. Es wird viel Arbeit in die Erforschung von verschiedenen Trägermaterialien, mechanischen Stimuli und Wirkstoffmolekülen gelegt, mit denen man den Prozess der chondrogenen Differenzierung *in vitro* sowie *in vivo* optimieren kann. Dabei spielt die Identifizierung sowohl positiv als auch negativ beeinflussender Faktoren eine wichtige Rolle. Eine noch bestehende Herausforderung bei der Regeneration von Gelenkknorpel ist die Entwicklung von Knorpel, der komplett die zonale Organisation des normalen Gelenkknorpels imitiert und langfristig kein Zeichen der Degeneration zeigt. Auch das Erreichen einer funktionsfähigen Integration des neu gebildeten Gewebes in das existierende Gewebe ist Gegenstand aktueller Forschung. Ohne diese Integration können mechanische Kräfte an der Grenzfläche schädliche Langzeiteffekte haben [7]. Weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet bringen eine Verbesserung in der Behandlung von Knorpeldefekten und geben vielen Patienten mit chronischen Gelenkschmerzen eine weitere Therapiemöglichkeit.

Es gibt in der Literatur bisher einige Untersuchungen über den Einfluss von 17-Estradiol auf humane Chondrozyten und Chondrozyten verschiedener Tierspezies. Talwar und seine Kollegen (2006) untersuchten beispielsweise eine Chondrozyten-Kultur von Ratten unter E2-Behandlung und wiesen nach 4 Tagen Kulturdauer eine Abnahme der Knorpeldicke, eine Hemmung der Chondrozytenproliferation und eine Zunahme der Chondrozytenreife in Richtung hypertrophe Chondrozyten nach [110]. Bei der Untersuchung von Knorpelzellen der Wachstumsfuge und der Ruhezone von Ratten kamen Nasatzky und seine Kollegen (1993 und 1994) zu ähnlichen Ergebnissen: 17 $\beta$ -Estradiol inhibierte in weiblichen Chondrozyten die Chondrozytenproliferation und die 3H-Thymidin-Inkorporation (als Zeichen der Proliferationshemmung), förderte jedoch durch die Stimulierung der RNA-Synthese, der alkalischen Phosphatase-Aktivität und der Kollagenproduktion die Differenzierung dieser Zellen. Bei männlichen Chondrozyten wurde eine im Vergleich zu den weiblichen Zellen geringere Proliferationshemmung und eine schwächere Stimulierung der alkalischen Phosphatase detektiert [100, 106]. Im Gegensatz zu der von Talwar und Nasatzky beschriebenen Hemmung der Chondrozytenproliferation durch 17 $\beta$ -Estradiol, beschrieben Somjen und seine Kollegen (1991) eine E2-bedingte Stimulierung der Proliferation der Chondrozyten des Epiphysenknorpels von Ratten [154]. Itagane und seine Kollegen (1991) zeigten dagegen, dass Sexualhormone und auch 17 $\beta$ -Estradiol überhaupt keinen Effekt auf die Proliferation von Kaninchen-Chondrozyten haben [155]. Ebenso

kamen Ab-Rahim und seine Kollegen (2008), die den Einfluss von TGF- $\beta$ 1 und 17 $\beta$ -Estradiol auf die Ablagerung der strukturellen Matrixkomponenten Glykosaminoglykan und Kollagen Typ II von Kaninchen-Chondrozyten untersuchten, zu dem Ergebnis, dass 17 $\beta$ -Estradiol die Synthese der Matrixbestandteile nicht beeinflusst [156]. Die gegensätzlichen Effekte der Estrogenwirkung auf Chondrozyten verschiedener Tierspezies liegen wahrscheinlich an den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (Kultursystem, Kulturzeit, Estrogenkonzentration und Medienzusammensetzung), der Verwendung von Chondrozyten unterschiedlicher Lokalisation und den Unterschieden zwischen den einzelnen Tierspezies.

Der Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf die *in vitro* Chondrogenese von adulten, humanen mesenchymalen Stammzellen wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht. Verwendung fanden dabei zunächst allein mesenchymale Stammzellen von männlichen Spendern. Unvorhersehbare Effekte auf die Stammzellen, die möglicherweise durch die Schwankung der Sexualhormonkonzentration während des Menstruationszyklus bei weiblichen Spenderinnen entstehen würden, wurden somit ausgeschlossen.

Während der chondrogenen Differenzierung konnten in den humanen MSCs intrazelluläre Sexualhormonrezeptoren (ER $\alpha$ , ER $\beta$  und AR) und der membranassoziierte Estrogenrezeptor GPR30 nachgewiesen werden. Das Vorhandensein dieser Sexualhormonrezeptoren während der *in vitro* Chondrogenese spricht dafür, dass Sexualhormone bei der Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle zu einer Knorpelzelle eine Rolle spielen. Die Sexualhormone DHEA, 17 $\beta$ -Estradiol und Testosteron hatten keinen Einfluss auf die Proliferation der hMSCs. 17 $\beta$ -Estradiol führte jedoch in der hochdichten Aggregatkultur dosisabhängig bei  $10^{-8}$  M zu einer signifikanten Hemmung der Synthese der extrazellulären Knorpelmatrix (sGAG und Kollagen Typ II). Eine E2-Konzentration von  $10^{-8}$  M ist durchaus physiologisch in der Synovialflüssigkeit vorherrschend, Schmidt und seine Kollegen detektierten bis zu 100-fach höhere Estrogenwerte in diesem Kompartiment im Vergleich zum Serum [157]. DHEA und Testosteron beeinflussten die chondrogene Differenzierung der hMSCs nicht. Durch die Zugabe von ICI 182.780 wurde die Hemmung der Chondrogenese noch weiter verstärkt. ICI 182.780 ist ein spezifischer Antagonist der beiden klassischen Estrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ), er wurde in der Literatur jedoch auch als Agonist des membranen Estrogenrezeptors GPR30 beschrieben [133]. Diese Ergebnisse wiesen die Richtung der weiteren Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Der erste Schwerpunkt lag bei der Identifizierung estrogensensibler Phasen im Verlauf des chondrogenen Differenzierungsprozesses. Als nächstes stand die

Analyse der membranvermittelten estrogenen Effekte über GPR30 auf die Beeinflussung der Chondrogenese der hMSCs im Vordergrund. Zuletzt wurde eine erste Untersuchung der Estrogenwirkung auf die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen von weiblichen Spenderinnen durchgeführt.

### 5.1 Estrogensensible Phasen im Verlauf der chondrogenen Differenzierung

Die Differenzierung einer mesenchymalen Stammzelle zu einer Knorpelzelle verläuft über mehrere Entwicklungsstufen. Aus einer mesenchymalen Stammzelle gehen die Progenitorzellen hervor, die sich im weiteren Verlauf entlang der chondrogenen Festlegung zu Chondroblasten und schließlich zu Chondrozyten differenzieren. Reife Chondrozyten können dem letzten Differenzierungsschritt zu hypertrophen Chondrozyten unterliegen. In allen zellulären Entwicklungsstufen, von der mesenchymalen Stammzelle bis hin zum reifen Chondrozyt, wurden die Sexualhormonrezeptoren  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$  und AR sowie der nicht-steroidale Estrogenrezeptor GPR30 nachgewiesen [104]. Das Vorhandensein dieser Rezeptoren macht es dem jeweiligen Sexualhormon möglich, auf den Prozess der Chondrogenese einzuwirken.  $17\beta$ -Estradiol führte in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M zu einer signifikanten Hemmung der Bildung von spezifischen Knorpelkomponenten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Phase der chondrogenen Differenzierung der humanen MSCs ein Differenzierungszeitraum von 21 Tagen gewählt. Die Anfangsphase des Differenzierungsprozesses, genauer gesagt die ersten sieben Tage, in welchen die hochdichte Zellaggregatkultur hauptsächlich aus chondrogenen Progenitorzellen besteht, stellte sich als die sensible Phase heraus, in der  $E_2$   $10^{-8}$  M seine hemmende Wirkung auf die Chondrogenese entfaltet. Sowohl bei einer  $E_2$ -Zugabe in den ersten sieben Tagen (Tag 0-7) als auch bei der Inkubation mit  $17\beta$ -Estradiol während der gesamten 21-tägigen Differenzierung (Tag 0-21) ergab sich eine signifikant verminderte Ablagerung der extrazellulären Knorpelkomponenten sGAG und Kollagen Typ II. Wurde  $17\beta$ -Estradiol zu späteren Differenzierungsphasen, also ab dem siebten Tag (Tag 7-14 oder Tag 14-21), zugegeben, zeigte sich keine negative Beeinflussung des Differenzierungsprozesses.

In einem weiteren Schritt wurde das membranimpermeable Konjugat  $E_2$ -BSA verwendet. Mit diesem konnten gezielt diejenigen estrogenen Effekte auf die chondrogene Differenzierung der hMSCs untersucht werden, die über membranassoziierte Estrogenrezeptoren vermittelt werden. Dadurch bestand die Möglichkeit, zwischen einer Estrogenwirkung über den klassischen Signalweg und dem nicht-klassischen Signalweg zu unterscheiden.  $E_2$ -BSA führte in der hochdichten Zellaggregatkultur zu einer signifikant reduzierten

Bildung struktureller Matrixkomponenten (sGAG und Kollagen Typ II). Dies entspricht einer Hemmung des Chondrogeneseprozesses über den nicht-klassischen Signalweg. Die hemmende Wirkung auf die Ablagerung knorpelspezifischer Matrixbestandteile erfolgte dabei während des gesamten 21-tägigen Differenzierungszeitraums, also bei der Inkubation der Aggregatkultur mit E2-BSA in jedem der definierten Zeiträume (Tag 0-7, Tag 7-14, Tag 14-21 und Tag 0-21). Es konnten damit keine sensiblen Phasen identifiziert werden, in denen E2-BSA die Chondrogenese nur sequenziell beeinflusst.

Für die Gesamtbewertung dieses Versuches wurde die fehlende Signifikanz des sGAG-Gehalts bei der biochemischen Bestimmung in den Zeiträumen von Tag 0 bis 7, Tag 14 bis 21 und Tag 0 bis 21 (vgl. Abschnitt 4.2) als vernachlässigbar betrachtet. Zum einen zeigten die Ergebnisse der immunhistochemischen und biochemischen Detektion des spezifischen Knorpelmarkers Kollagen Typ II in jedem Zeitraum (E2-BSA von Tag 0-7, Tag 7-14, Tag 14-21 und Tag 0-21) ein einheitliches Bild. Zum anderen sprach die histologische Anfärbung der Schnitte, die in diesen Zeiträumen mit E2-BSA inkubiert wurden, für eine deutlich geringere Ablagerung von sGAG im Vergleich zur Kontrolle.

Während  $17\beta$ -Estradiol seine hemmende Wirkung auf die Chondrogenese der mesenchymalen Stammzellen in den ersten sieben Tagen des Differenzierungsprozesses ausübte, zeigte E2-BSA über die Wirkung an nicht-klassischen Rezeptoren in jedem Differenzierungsstadium, also von der mesenchymalen Stammzelle bis zum reifen Chondrozyten, eine negative Beeinflussung der Ablagerung chondrogener Matrixkomponenten. Eine mögliche Erklärung dieser verschiedenen Ergebnisse ist, dass bei einer Estrogenzugabe zu späteren Differenzierungszeitpunkten (E2 von Tag 7-14 und Tag 14-21) die hemmende Wirkung, die über membranassoziierte Estrogenrezeptoren ausgelöst wird, über die klassischen, intrazellulären Estrogenrezeptoren kompensiert werden kann. Eine solche Kompensation ist bei der Verwendung des membranimpermeablen Konjugats E2-BSA nicht mehr möglich, woraus in diesem Fall eine negative Regulation der Chondrogenese über den gesamten 21-tägigen Differenzierungszeitraum resultiert. Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass E2-BSA durch die Aktivierung membraner Estrogenrezeptoren die Expression von weiteren membranen Estrogenrezeptoren im Verlauf der chondrogenen Differenzierung bewirkt (sog. Hochregulation der Rezeptordichte). Damit kann E2-BSA auch in späteren Differenzierungsphasen die Ablagerung von Knorpelbestandteilen hemmen.

## 5.2 Membranvermittelte Estrogeneffekte über GPR30

Estrogene können über klassische und nicht-klassische Signalwege auf ihre Zielzellen einwirken. Der klassische Weg beruht auf der Interaktion von  $17\beta$ -Estradiol mit den beiden intrazellulären Estrogenrezeptoren ( $ER\alpha$  und  $ER\beta$ ), worüber die Transkription verschiedener Gene beeinflusst wird. Die nicht-klassischen Signalwege werden über die an Membranproteine assoziierte klassische Estrogenrezeptoren oder über nicht-steroidale Rezeptoren, wie dem GPR30, vermittelt.

Die estrogenvermittelte Hemmung der chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen bei  $10^{-8}$  M konnte durch ICI 182.780 nicht aufgehoben werden. Es wurde vielmehr eine noch weiter verringerte Ablagerung von strukturellen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (sGAG und Kollagen Typ II) gemessen. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die hemmende Wirkung nicht über die intrazellulären, klassischen ER, sondern über den membranassoziierten, nicht-steroidalen Estrogenrezeptor GPR30 vermittelt wird, an dem ICI 182.780 als Agonist wirkt [133]. GPR30 ist ein G-Protein gekoppelter Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor und gilt als spezifischer  $17\beta$ -Estradiol-Rezeptor des nicht-klassischen Wirkungsweges [131, 133].

Zur gezielten Analyse der Beteiligung von GPR30 an der Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen, wurde die Wirkung von E2, E2-BSA, ICI 182.780 und G-1 untersucht. E2, E2-BSA, ICI 182.780 sowie G-1 gelten als agonistische Komponenten am GPR30. Die mit ICI 182.780 oder G-1 inkubierten Aggregate zeigten ähnlich der E2- und E2-BSA-Gruppen eine verminderte makroskopische Größe und eine signifikant reduzierte Ablagerung der strukturellen Matrixbestandteile Glykosaminoglykan und Kollagen Typ II. G-1 konnte damit als ein unabhängiges Substrat der Estrogenwirkung die Produktion der extrazellulären Matrix während der Chondrogenese der hMSCs über den nicht-steroidalen Estrogenrezeptor GPR30 hemmen.

Das Substrat G15, ein GPR30-Antagonist, wurde verwendet, um die negative Wirkung von E2 und G1 auf die Chondrogenese der humanen MSCs zu blockieren. Die Zugabe von G15 allein führte zu keiner Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen. G15 konnte die negativen Effekte auf die Chondrogenese, die durch Agonisten des GPR30 (E2 und G1) ausgelöst werden, in signifikanter Weise aufheben: Sobald die Zellaggregate mit G15 und E2 bzw. G15 und G1 kokubiert wurden, wurde eine chondrogene Differenzierung und Produktion der Knorpelmatrix wie unter den Chondrogenese induzierenden Kontrollbedingungen mit TGF- $\beta$ 1 und Dexamethason beobachtet. Dies spricht für eine erfolgreiche Blockierung des membranen GPR30 durch G15.

Diese Ergebnisse zeigen, dass  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-8}$  M) als negativer Regulator der Chondrogenese die Synthese von typischen Bestandteilen der extrazellulären Knorpelmatrix über membranvermittelte Wege unterdrückt. GPR30 ist als membranassoziierter Rezeptor in estrogene Signalwege involviert [133] und wurde in der hochdichten Zellaggregatkultur im gesamten Verlauf der 21-tägigen chondrogenen Differenzierung der hMSCs nachgewiesen. Zusammenfassend kann damit festgehalten werden, dass die Hemmung der Chondrogenese durch  $17\beta$ -Estradiol in der Konzentration  $10^{-8}$  M durch den membranständigen Estrogenrezeptor GPR30 vermittelt wird. Bei der Estrogenwirkung über GPR30 wird der nicht-klassische Signalwege aktiviert. Dabei kommt es über die Stimulierung von Rezeptor-assoziierten G-Proteinen zur Bildung bestimmter intrazellulärer Signale und zur Auslösung zahlreicher intrazellulärer Signalkaskaden (vgl. Abschnitt 1.8). Interessanterweise wird durch GPR30 auch der Tyrosinkinaserzeptor EGFR transaktiviert [119, 128, 130]. Das Rezeptorsubstrat EGF gilt in der Literatur durch seine Interaktion mit dem MAPK-Signalweg als negativer Regulator der Chondrogenese [139]. Dies stimmt mit der von uns beobachteten Beeinflussung der Chondrogenese und verminderten Knorpelmatrixproduktion der hMSCs durch  $17\beta$ -Estradiol überein.

Die Stimulierung von membranassozierten Signalwegen durch Estrogen wurde bereits in einer Studie von Kinney und seinen Kollegen (2005) beschrieben. Sie untersuchten unter physiologischen Bedingungen die Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol auf humane männliche und weibliche Chondrozyten und stellten fest, dass E2 den Stoffwechsel der Chondrozyten durch die intrazellulären, klassischen Estrogenrezeptormechanismen reguliert. Bei weiblichen Zellen wurde zusätzlich eine Aktivierung membranassoziierter Rezeptoren und die Stimulierung schneller Estrogeneffekte gemessen. Kinney und seine Kollegen vermuteten, dass höhere lokale weibliche E2-Konzentrationen von  $10^{-8}$  M diesen Weg aktivieren. Bei dieser Konzentration wurden in ihrer Arbeit die schnellen membranvermittelten Effekte maximal stimuliert [158].

In Anbetracht dieser Studie liegt die Vermutung nahe, dass die Hemmung der Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen bei einer Estrogenkonzentration von  $10^{-8}$  M durch den membranständigen Estrogenrezeptor GPR30 vermittelt wird, bei niedrigeren Estrogenkonzentrationen ( $E2\ 10^{-9}$  M,  $E2\ 10^{-10}$  M und  $E2\ 10^{-11}$  M) kann die hemmende Wirkung dagegen durch die intrazellulären, klassischen Estrogenrezeptoren ( $ER\alpha$  und  $ER\beta$ ) kompensiert werden.

### 5.3 Estrogenwirkung auf die Chondrogenese von MSCs weiblicher Spenderinnen

Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der weibliche Organismus vor der Menopause höheren Estrogenspiegeln ausgesetzt als der männliche Organismus. Bei erwachsenen Männern liegt die Konzentration des metabolisch aktiven  $17\beta$ -Estradiols durchschnittlich bei 37 – 148 pM, wohingegen bei prämenopausalen Frauen abhängig vom Menstruationszyklus  $17\beta$ -Estradiol-Werte von 73 – 2753 pM gemessen werden. In der Schwangerschaft steigen die E2-Konzentrationen noch weiter auf bis zu 6000 pM an. Nach der Menopause sinken die  $17\beta$ -Estradiol-Spiegel dann auf Werte kleiner 73 pM ab [146]. Interessanterweise findet sich jedoch allein in der Synovialflüssigkeit kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Konzentration von Sexualhormonen [159]. Dies lässt bei in vivo Untersuchungen zur chondrogenen Differenzierung von hMSCs ein gleiches Chondrogeneseverhalten bei Frauen und Männern erwarten.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei Frauen die Menstruationszyklus-abhängigen Schwankungen der Estrogenkonzentration und die höheren Hormonspiegel während der Schwangerschaft einen Einfluss auf die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks haben. Auch existiert keine wissenschaftliche Kenntnis darüber, ob die Ergebnisse von in vitro Untersuchungen, die an weiblichen hMSCs durchgeführt werden, abhängig vom Entnahmezeitpunkt dieser in Bezug auf den Menstruationszyklus sind. Es ist nicht bekannt, ob weibliche mesenchymale Stammzellen je nach Menstruationszyklusphase eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber  $17\beta$ -Estradiol oder etwa eine Zyklus-abhängige Hormonrezeptorausstattung aufweisen.

Für therapeutische Ansätze in der Regenerativen Medizin ist es wichtig, ein Therapieverfahren für beide Geschlechter anbieten zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig in einer in vitro Zellaggregatkultur der Einfluss von  $17\beta$ -Estradiol auf die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen adulter weiblicher Spenderinnen untersucht.

Bei der Betrachtung der experimentellen Ergebnisse zeigt sich auch bei hMSCs von weiblichen Spenderinnen eine negative Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung durch E2 in der Konzentration  $10^{-8}$  M: Unter Behandlung mit dieser Estrogenkonzentration weisen die Pellets eine verminderte makroskopische Größe auf und die histologischen Anfärbungen sowie biochemischen Analysen bestätigen eine verminderte Produktion der speziellen extrazellulären Knorpelmatrix. Die Zugabe von  $17\beta$ -Estradiol in einer der geringeren physiologischen Konzentration (E2  $10^{-9}$  M, E2  $10^{-10}$  M und E2  $10^{-11}$  M) zeigt



dagegen ein uneinheitliches Bild: Während es bei der makro- und mikroskopischen Betrachtung den Anschein macht, dass es neben  $E2\ 10^{-8}\text{ M}$  auch bei  $E2\ 10^{-11}\text{ M}$  zu einer verminderten Ablagerung von Bestandteilen der extrazellulären Knorpelmatrix (sGAG und Kollagen Typ II) gekommen ist, liefert die biochemische Analyse ein anderes Ergebnis. Dort ergab lediglich die Bestimmung des sGAG-Gehalts für  $E2\ 10^{-9}\text{ M}$  einen signifikant erniedrigten Wert.

Für die Interpretation dieser Ergebnisse sind folgende Aspekte zu beachten: Bei der Auswertung der biochemisch gemessenen Ablagerung extrazellulärer Knorpelbestandteile sind bei den verschiedenen Spenderinnen unter der gleichen experimentellen Bedingung starke interindividuelle Schwankungen zu beobachten, ganz im Gegensatz zum Versuch der Dosis-Wirkungs-Beziehung der Estrogenzugabe bei männlichen hMSCs (vgl. Abschnitt 1.10.5). Die Inkubation der Zellkultur mit niedrigeren Estrogenkonzentrationen ( $E2\ 10^{-9}\text{ M}$ ,  $E2\ 10^{-10}\text{ M}$  und  $E2\ 10^{-11}\text{ M}$ ) führte bei den MSCs einzelner Spenderinnen zu deutlich verringerter Matrixproduktion, bei den MSCs anderer Spenderinnen dagegen zu stark erhöhter Ablagerung der Knorpelkomponenten Kollagen Typ II und Glykosaminoglykan. Diese spenderspezifische Heterogenität führt zu großen Standardabweichungen in der graphischen Darstellung und Statistik (vgl. Abbildung 11 D)). Bereits in der Vergangenheit wurden mesenchymale Stammzellen innerhalb eines Stammzellpools in Bezug auf ihre Fähigkeit, sich entlang einer mesenchymalen Zelllinien zu differenzieren, als eine sehr heterogene Gruppe beschrieben [68, 69].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse eine Hemmung der chondrogenen Differenzierung von hMSCs weiblicher Knochenmarkspenderinnen durch  $E2$  in der Konzentration  $10^{-8}\text{ M}$  belegen. Dies entspricht den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen an männlichen Stammzellen. Bei der Inkubation der hochdichten Zellaggregatkultur mit niedrigeren Estrogenkonzentration ( $E2\ 10^{-9}\text{ M}$ ,  $E2\ 10^{-10}\text{ M}$  und  $E2\ 10^{-11}\text{ M}$ ) konnte im Mittel keine signifikante Hemmung der Ablagerung knorpelspezifischer Matrixbestandteile gemessen werden. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass die starke interindividuelle Heterogenität der Stammzellen auf den Zeitpunkt der MSC-Entnahme innerhalb des weiblichen Menstruationszyklus und damit auf eine unterschiedliche Sensibilität der MSCs für  $E2$  zurückzuführen ist.

## 5.4 Ausblick

Die Erkenntnis, dass  $17\beta$ -Estradiol bei  $10^{-8}\text{ M}$  über GPR30 ein negativer Regulator der Chondrogenese ist, kann in Zukunft gezielt in den Therapieverfahren der Regenerativen Medizin genutzt werden. In weiteren experimentellen in vitro Untersuchungen sollten zu-

nächst die bisher noch unbekannten Signalkaskaden, die bei einer Aktivierung von GPR30 ausgelöst werden, identifiziert werden. Werden in einem nächsten Schritt mesenchymale Stammzellen *in vivo* für die Regeneration und Reparatur eines Gelenkknorpeldefekts verwendet, beispielsweise in Form einer MSC-Transplantation oder eines materialbasierten Modells, kann die Zugabe eines spezifischen GPR30-Antagonisten die erfolgreiche chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen unterstützen und den negativen Einfluss von  $17\beta$ -Estradiol unterbinden. Die in den letzten Jahren stark vorangeschrittene Entwicklung von Trägermaterialien, die kontinuierlich eingebrachte Wirkstoffmoleküle sezernieren und damit die Differenzierung und die Matrixproduktion der Zellen kontrollieren, stellt einen entscheidenden Fortschritt für die Übertragung von *in vitro* Untersuchungen in den klinischen Alltag dar [160]. Die Verwendung von Trägermaterialien, die kontinuierlich einen GPR30-Antagonisten freisetzen, ist ein denkbare Verfahren, das zukünftig für die Regeneration von Knorpelgewebe angewendet werden kann.

## 6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in den Bereichen der Regenerativen Medizin und des Tissue Engineerings erzielt. Für die Regeneration von Gelenkknorpeldefekten wird nach der optimalen Kombination aus geeigneten Zellen, Signalmolekülen, Trägermaterialien und externen mechanischen Stimuli, mit denen ein gesundes und funktionsfähiges Gewebe wiederhergestellt werden kann, geforscht.

Folgende Vorergebnisse bildeten die Ausgangslage für die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden: Während der chondrogenen Differenzierung der hMSCs zeigten sich die intrazellulären Sexualhormonrezeptoren ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , AR) und der membranständige Estrogenrezeptor GPR30 nachweisbar. Die Sexualhormone DHEA,  $17\beta$ -Estradiol und Testosteron hatten keinen Einfluss auf die Proliferation der hMSCs. Das Estrogen  $17\beta$ -Estradiol fungierte jedoch dosisabhängig bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M als ein Inhibitor der chondrogenen Differenzierung der hMSCs.

In einer ersten Untersuchung konnte die Anfangsphase der chondrogenen Differenzierung der hMSCs als die sensible Phase identifiziert werden, in welcher die hemmende Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol ( $10^{-8}$  M) auf die Ablagerung struktureller Knorpelbestandteile erfolgt. Um die negative Beeinflussung von  $17\beta$ -Estradiol auf die Chondrogenese genauer zu analysieren, wurde die hochdichte Zellaggregatkultur mit  $17\beta$ -Estradiol, ICI 182.780, dem membranimpermeablen Konjugat E2-BSA, dem spezifischen GPR30-Agonisten G-1 und GPR30-Antagonisten G15 inkubiert. Die durch  $17\beta$ -Estradiol ausgelöste Hemmung der Synthese knorpelspezifischer Matrixbestandteile wurde durch ICI 182.780, der ein Rezeptorantagonist der beiden klassischen nukleären Estrogenrezeptoren ist, noch weiter verstärkt. ICI 182.780 wurde in der Literatur jedoch auch als Agonist an dem membranständigen Estrogenrezeptor GPR30 beschrieben [133]. GPR30 konnte in einer weiteren Versuchsreihe als derjenige Estrogenrezeptor identifiziert werden, über welchen  $17\beta$ -Estradiol seine hemmende Wirkung auf den Chondrogeneseprozess entfaltet. So wurde sowohl durch  $17\beta$ -Estradiol, E2-BSA und ICI 182.780 als auch durch den spezifischen GPR30-Agonisten G-1 eine signifikant reduzierte Ablagerung der Knorpelmatrixbestandteile Kollagen Typ II und Glykosaminoglykan ausgelöst. Diese negative Beeinflussung konnte durch den spezifischen GPR30-Antagonisten G15 signifikant aufgehoben werden. Die Beeinflussung der chondrogenen Differenzierung von hMSCs durch das Estrogen  $17\beta$ -Estradiol wurde hiermit zum ersten Mal in der Literatur beschrieben.

Zuletzt ergaben sich erste Anhaltspunkte dafür, dass  $17\beta$ -Estradiol bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M auch die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen von weiblichen Spenderinnen hemmt.

## 7 Literatur

- [1] G. R. Abecasis, S. S. Cherny, W. O. Cookson, and L. R. Cardon. Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat. Genet.*, 30(1):97–101, Jan 2002.
- [2] S. Rehart and H. Lehnert. Aktuelle Aspekte zur Arthrose. *Z. Rheumatol.*, 67(4):305–314, Jun 2008.
- [3] H. Schmitt. Degenerative Gelenkerkrankungen nach Leistungssport. *Dtsch. Z. Sportmed.*, 57(10):248–254, 2006.
- [4] B. Schewe and J. Fritz. Knorpelverletzungen am Kniegelenk. *Orthopädie und Unfallchirurgie update*, 3(2):77–94, Feb 2008.
- [5] B. E. Bobick, F. H. Chen, A. M. Le, and R. S. Tuan. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, 87(4):351–371, Dec 2009.
- [6] C. Brochhausen, R. Zehbe, Schubert H. Gross, U., and C. J. Kirkpatrick. Innovative Perspektiven für das Tissue Engineering zur Therapie von Gelenknorpeldefekten. *BIOMaterialien*, 7(4):278–285, 2006.
- [7] J. S. Temenoff and A. G. Mikos. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21(5):431–440, Mar 2000.
- [8] J. A. Buckwalter and H. J. Mankin. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*, 47:487–504, 1998.
- [9] P. Angele, J. U. Yoo, C. Smith, J. Mansour, K. J. Jepsen, M. Nerlich, and B. Johnstone. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J. Orthop. Res.*, 21(3):451–457, May 2003.
- [10] J. A. Buckwalter and H. J. Mankin. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 47:477–486, 1998.
- [11] W. Kühnel. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*, 11., komplett überarbeitete und ergänzende Auflage:140–143, 2002.
- [12] V. Martinek. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. *Dtsch. Z. Sportmed.*, 54(6):166–170, 2003.
- [13] J. A. Buckwalter. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse:

- experimental studies. *J Rheumatol Suppl*, 43:13–15, Feb 1995.
- [14] J. A. Buckwalter. Activity vs. rest in the treatment of bone, soft tissue and joint injuries. *Iowa Orthop J*, 15:29–42, 1995.
- [15] J. A. Martin and J. A. Buckwalter. Articular cartilage aging and degeneration. *Sports Med. and Arthrosc.*, 4:263–275, 1996.
- [16] J. A. Buckwalter, P. J. Roughley, and L. C. Rosenberg. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc. Res. Tech.*, 28(5):398–408, Aug 1994.
- [17] D. Eyre. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.*, 4(1):30–35, 2002.
- [18] M. Otero and M. B. Goldring. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.*, 9(5):220, 2007.
- [19] P. J. Roughley. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater*, 12:92–101, 2006.
- [20] J. U. Yoo, T. S. Barthel, K. Nishimura, L. Solchaga, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, and B. Johnstone. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 80(12):1745–1757, Dec 1998.
- [21] M. Brittberg and C. S. Winalski. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A(Suppl 2):58–69, 2003.
- [22] G. P. Dowthwaite, J. C. Bishop, S. N. Redman, I. M. Khan, P. Rooney, D. J. Evans, L. Houghton, Z. Bayram, S. Boyer, B. Thomson, M. S. Wolfe, and C. W. Archer. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J. Cell. Sci.*, 117(6):889–897, Feb 2004.
- [23] J. Bruns and J. Steinhagen. Der Knorpelschaden als präarthrotische Deformität – Biologische Grundlagen. *Dtsch. Z. Sportmed.*, 51(2):42–47, 2000.
- [24] J. A. Buckwalter. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther*, 28(4):192–202, Oct 1998.
- [25] M. Brittberg, L. Peterson, E. Sjogren-Jansson, T. Tallheden, and A. Lindahl. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A(Suppl 3):109–115, 2003.
- [26] M. Fuchs, R. Vosschenrich, C. Dumont, and K.M. Stürmer. Refixation osteochondraler Fragmente mit resorbierbaren Implantaten - Erste Ergebnisse einer retrospektiven Studie. *Chirurg*, 74(6):554–561, 2003.

- [27] J.P. Petersen, A. Ruecker, D. von Stechow, P. Adamietz, R. Poertner, J. M. Rueger, and N. M. Meenen. Present and Future Therapies of Articular Cartilage Defects. *Eur J Trauma*, 29:1–10, Feb 2003.
- [28] L. Peterson, T. Minas, M. Brittberg, and A. Lindahl. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A(Suppl 2):17–24, 2003.
- [29] M. V. Risbud and M. Sitterling. Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol.*, 20(8):351–356, Aug 2002.
- [30] R. Cancedda, B. Dozin, P. Giannoni, and R. Quarto. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.*, 22(1):81–91, Mar 2003.
- [31] P. Angele, R. Muller, D. Schumann, C. Englert, J. Zellner, B. Johnstone, J. Yoo, J. Hammer, J. Fierlbeck, M. K. Angele, M. Nerlich, and R. Kujat. Characterization of esterified hyaluronan-gelatin polymer composites suitable for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*, 91(2):416–427, Nov 2009.
- [32] R. Tuli, W. J. Li, and R. S. Tuan. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.*, 5(5):235–238, 2003.
- [33] C. Erggelet, B. Mandelbaum, and Lahm A. Der Knorpelschaden als therapeutische Aufgabe – Klinische Grundlagen. *Dtsch. Z. Sportmed.*, 51(2):48–54, 2000.
- [34] J. Cohnheim. Archiv. *Arch Path Anat Physiol Klin Med*, 40(1), 1867.
- [35] D. J. Prockop. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309):71–74, Apr 1997.
- [36] A. J. Friedenstein, I. I. Piatetzky-Shapiro, and K. V. Petrakova. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16(3):381–390, Dec 1966.
- [37] A. J. Friedenstein, U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luria, and I. A. Ruadkow. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.*, 2(2):83–92, 1974.
- [38] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, M. J. Murphy, and F. P. Barry. Improved chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *EP0948255*, <http://www.freepatentsonline.com/EP0948255B1.html>, Okt 2005.
- [39] A. I. Caplan. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 9(5):641–650, Sep 1991.

- [40] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411):143–147, Apr 1999.
- [41] T. Fukumoto, J. W. Sperling, A. Sanyal, J. S. Fitzsimmons, G. G. Reinholz, C. A. Conover, and S. W. O’Driscoll. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthr. Cartil.*, 1(1):55–64, Jan 2003.
- [42] H. Nakahara, S. P. Bruder, S. E. Haynesworth, J. J. Holecek, M. A. Baber, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*, 11(3):181–188, 1990.
- [43] U. Noth, A. M. Osyczka, R. Tuli, N. J. Hickok, K. G. Danielson, and R. S. Tuan. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J. Orthop. Res.*, 20(5):1060–1069, Sep 2002.
- [44] S. Gronthos, D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, and J. M. Gimble. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.*, 189(1):54–63, Oct 2001.
- [45] D. A. De Ugarte, K. Morizono, A. Elbarbary, Z. Alfonso, P. A. Zuk, M. Zhu, J. L. Dragoo, P. Ashjian, B. Thomas, P. Benhaim, I. Chen, J. Fraser, and M. H. Hedrick. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs (Print)*, 174(3):101–109, 2003.
- [46] J. L. Dragoo, B. Samimi, M. Zhu, S. L. Hame, B. J. Thomas, J. R. Lieberman, M. H. Hedrick, and P. Benhaim. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br*, 85(5):740–747, Jul 2003.
- [47] C. De Bari, F. Dell’Accio, P. Tylzanowski, and F. P. Luyten. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.*, 44(8):1928–1942, Aug 2001.
- [48] R. J. Jankowski, B. M. Deasy, and J. Huard. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.*, 9(10):642–647, May 2002.
- [49] W. A. Noort, A. B. Kruisselbrink, P. S. in’t Anker, M. Kruger, R. L. van Bezooijen, R. A. de Paus, M. H. Heemskerk, C. W. Lowik, J. H. Falkenburg, R. Willemze, and W. E. Fibbe. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical

- cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol.*, 30(8):870–878, Aug 2002.
- [50] M. Miura, S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L. W. Fisher, P. G. Robey, and S. Shi. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(10):5807–5812, May 2003.
- [51] R. Sarugaser, D. Lickorish, D. Baksh, M. M. Hosseini, and J. E. Davies. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*, 23(2):220–229, Feb 2005.
- [52] P. Bianco, M. Riminucci, S. Gronthos, and P. G. Robey. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19(3):180–192, 2001.
- [53] J. M. Gimble, F. Guilak, S. Nuttall, M. E. amd Sathishkumar, M. Vidal, and B. A. Bunnell. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother*, 35(3):228–238, Mai 2008.
- [54] S. P. Bruder, N. Jaiswal, and S. E. Haynesworth. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.*, 64(2):278–294, Feb 1997.
- [55] S. P. Bruder, A. A. Kurth, M. Shea, W. C. Hayes, N. Jaiswal, and S. Kadiyala. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, 16(2):155–162, Mar 1998.
- [56] S. Kadiyala, R. G. Young, M. A. Thiede, and S. P. Bruder. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*, 6(2):125–134, 1997.
- [57] R. G. Young, D. L. Butler, W. Weber, A. I. Caplan, S. L. Gordon, and D. J. Fink. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop. Res.*, 16(4):406–413, Jul 1998.
- [58] H. A. Awad, D. L. Butler, G. P. Boivin, F. N. Smith, P. Malaviya, B. Huibregtse, and A. I. Caplan. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng.*, 5(3):267–277, Jun 1999.
- [59] M. C. Galmiche, V. E. Koteliensky, J. Briere, P. Herve, and P. Charbord. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, 82(1):66–76,



- Jul 1993.
- [60] G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cos-su, and F. Mavilio. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279(5356):1528–1530, Mar 1998.
  - [61] J. E. Dennis, A. Merriam, A. Awadallah, J. U. Yoo, B. Johnstone, and A. I. Caplan. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J. Bone Miner. Res.*, 14(5):700–709, 1999.
  - [62] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(9):726–736, Aug 2008.
  - [63] S. Gojo, N. Gojo, Y. Takeda, T. Mori, H. Abe, S. Kyo, J. Hata, and A. Umezawa. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.*, 288(1):51–59, Aug 2003.
  - [64] B. E. Petersen, W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger, and J. P. Goff. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284(5417):1168–1170, May 1999.
  - [65] K. D. Lee, T. K. Kuo, J. Whang-Peng, Y. F. Chung, C. T. Lin, S. H. Chou, J. R. Chen, Y. P. Chen, and O. K. Lee. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 40(6):1275–1284, Dec 2004.
  - [66] W. Deng, M. Obrocka, I. Fischer, and D. J. Prockop. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282(1):148–152, Mar 2001.
  - [67] K. Sugaya. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int. Rev. Cytol.*, 228:1–30, 2003.
  - [68] D. G. Phinney, G. Kopen, W. Righter, S. Webster, N. Tremain, and D. J. Prockop. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.*, 75(3):424–436, Dec 1999.
  - [69] A. Muraglia, R. Cancedda, and R. Quarto. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell. Sci.*, 113 ( Pt 7):1161–1166, Apr 2000.
  - [70] D. Baksh, L. Song, and R. S. Tuan. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.*, 8(3):301–316, 2004.

- [71] M. K. El Tamer and R. L. Reis. Progenitor and stem cells for bone and cartilage regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*, 3(5):327–337, Jul 2009.
- [72] S. E. Haynesworth, M. A. Baber, and A. I. Caplan. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J. Cell. Physiol.*, 166(1):585–592, Mar 1996.
- [73] F. P. Barry and J. M. Murphy. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(4):568–584, Apr 2004.
- [74] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Lavery. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 391 Suppl:26–33, Oct 2001.
- [75] B. C. Heng, T. Cao, and E. H. Lee. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells*, 22(7):1152–1167, 2004.
- [76] F. Barry, R. E. Boynton, B. Liu, and J. M. Murphy. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp. Cell Res.*, 268(2):189–200, Aug 2001.
- [77] M. Hashimoto, T. Nakasa, T. Hikata, and H. Asahara. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev*, 28(3):464–481, May 2008.
- [78] M. Pei, J. Seidel, G. Vunjak-Novakovic, and L. E. Freed. Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294(1):149–154, May 2002.
- [79] A. Derfoul, G. L. Perkins, D. J. Hall, and R. S. Tuan. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*, 24(6):1487–1495, Jun 2006.
- [80] D. P. Lennon, S. E. Haynesworth, R. G. Young, J. E. Dennis, and A. I. Caplan. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.*, 219(1):211–222, Jul 1995.
- [81] B. Johnstone, T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg, and J. U. Yoo. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res.*, 238(1):265–272, Jan 1998.
- [82] A. E. Grigoriadis, J. E. Aubin, and J. N. Heersche. Effects of dexamethasone and vitamin D3 on cartilage differentiation in a clonal chondrogenic cell population.

- Endocrinology*, 125(4):2103–2110, Oct 1989.
- [83] I. Sekiya, P. Koopman, K. Tsuji, S. Mertin, V. Harley, Y. Yamada, K. Shinomiya, A. Nifuji, and M. Noda. Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. *J. Endocrinol.*, 169(3):573–579, Jun 2001.
  - [84] T. Chepda, M. Cadau, P. Girin, J. Frey, and A. Chamson. Monitoring of ascorbate at a constant rate in cell culture: effect on cell growth. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 37(1):26–30, Jan 2001.
  - [85] D. Darr, S. Combs, and S. Pinnell. Ascorbic acid and collagen synthesis: rethinking a role for lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 307(2):331–335, Dec 1993.
  - [86] M. Pacifici. Independent secretion of proteoglycans and collagens in chick chondrocyte cultures during acute ascorbic acid treatment. *Biochem. J.*, 272(1):193–199, Nov 1990.
  - [87] S. Bajada, I. Mazakova, J. B. Richardson, and N. Ashammakhi. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(4):169–183, Jun 2008.
  - [88] S. Wakitani, K. Imoto, T. Yamamoto, M. Saito, N. Murata, and M. Yoneda. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthr. Cartil.*, 10(3):199–206, Mar 2002.
  - [89] S. Wakitani, T. Mitsuoka, N. Nakamura, Y. Toritsuka, Y. Nakamura, and S. Horibe. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant*, 13(5):595–600, 2004.
  - [90] S. Wakitani, M. Nawata, K. Tensho, T. Okabe, H. Machida, and H. Ohgushi. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med*, 1(1):74–79, 2007.
  - [91] R. Kuroda, K. Ishida, T. Matsumoto, T. Akisue, H. Fujioka, K. Mizuno, H. Ohgushi, S. Wakitani, and M. Kurosaka. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthr. Cartil.*, 15(2):226–231, Feb 2007.
  - [92] G. G. Wulf, B. Chapuy, and L. Trümper. Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks. *Med. Klin.*, 101(5):408–413, Mai 2006.

- [93] E. M. Horwitz, D. J. Prockop, P. L. Gordon, W. W. Koo, L. A. Fitzpatrick, M. D. Neel, M. E. McCarville, P. J. Orchard, R. E. Pyeritz, and M. K. Brenner. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*, 97(5):1227–1231, Mar 2001.
- [94] M. Di Nicola, C. Carlo-Stella, M. Magni, M. Milanesi, P. D. Longoni, P. Matteucci, S. Grisanti, and A. M. Gianni. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10):3838–3843, May 2002.
- [95] S. T. Lee, J. H. Jang, J. W. Cheong, J. S. Kim, H. Y. Maeng, J. S. Hahn, Y. W. Ko, and Y. H. Min. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br. J. Haematol.*, 118(4):1128–1131, Sep 2002.
- [96] M. E. Wierman. Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv Physiol Educ*, 31(1):26–33, Mar 2007.
- [97] J. Matthews and J. A. Gustafsson. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.*, 3(5):281–292, Aug 2003.
- [98] T. Yamamoto, F. Saatcioglu, and T. Matsuda. Cross-talk between bone morphogenic proteins and estrogen receptor signaling. *Endocrinology*, 143(7):2635–2642, Jul 2002.
- [99] E. O. Abu, A. Horner, V. Kusec, J. T. Triffitt, and J. E. Compston. The localization of androgen receptors in human bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(10):3493–3497, Oct 1997.
- [100] E. Nasatzky, Z. Schwartz, W. A. Soskolne, B. P. Brooks, D. D. Dean, B. D. Boyan, and A. Ornoy. Evidence for receptors specific for 17 beta-estradiol and testosterone in chondrocyte cultures. *Connect. Tissue Res.*, 30(4):277–294, 1994.
- [101] H. Claassen, J. Hassenpflug, M. Schunke, W. Sierralta, H. Thole, and B. Kurz. Immunohistochemical detection of estrogen receptor alpha in articular chondrocytes from cows, pigs and humans: in situ and in vitro results. *Ann. Anat.*, 183(3):223–227, May 2001.
- [102] T. Ushiyama, H. Ueyama, K. Inoue, I. Ohkubo, and S. Hukuda. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthr.*

- Cartil.*, 7(6):560–566, Nov 1999.
- [103] P. Richette, M. F. Dumontier, M. Francois, L. Tsagris, C. Korwin-Zmijowska, F. Rannou, and M. T. Corvol. Dual effects of 17beta-oestradiol on interleukin 1beta-induced proteoglycan degradation in chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.*, 63(2):191–199, Feb 2004.
  - [104] Z. Jenei-Lanzl, R. H. Straub, T. Dienstknecht, M. Huber, M. Hager, S. Grassel, R. Kujat, M. K. Angele, M. Nerlich, and P. Angele. Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling. *Arthritis Rheum.*, 62(4):1088–1096, Apr 2010.
  - [105] B. C. van der Eerden, E. F. Gevers, C. W. Lowik, M. Karperien, and J. M. Wit. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. *Bone*, 30(3):478–485, Mar 2002.
  - [106] E. Nasatzky, Z. Schwartz, B. D. Boyan, W. A. Soskolne, and A. Ornoy. Sex-dependent effects of 17-beta-estradiol on chondrocyte differentiation in culture. *J. Cell. Physiol.*, 154(2):359–367, Feb 1993.
  - [107] R. S. Richmond, C. S. Carlson, T. C. Register, G. Shanker, and R. F. Loeser. 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.*, 43(9):2081–2090, Sep 2000.
  - [108] L. Savendahl. Hormonal regulation of growth plate cartilage. *Horm. Res.*, 64(Suppl 2):94–97, 2005.
  - [109] V. L. Sylvia, J. Walton, D. Lopez, D. D. Dean, B. D. Boyan, and Z. Schwartz. 17 beta-estradiol-BSA conjugates and 17 beta-estradiol regulate growth plate chondrocytes by common membrane associated mechanisms involving PKC dependent and independent signal transduction. *J. Cell. Biochem.*, 81(3):413–429, 2001.
  - [110] R. M. Talwar, B. S. Wong, K. Svoboda, and R. P. Harper. Effects of estrogen on chondrocyte proliferation and collagen synthesis in skeletally mature articular cartilage. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 64(4):600–609, Apr 2006.
  - [111] T. D. Spector and G. D. Campion. Generalised osteoarthritis: a hormonally mediated disease. *Ann. Rheum. Dis.*, 48(6):523–527, Jun 1989.
  - [112] D. T. Felson and Y. Zhang. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum.*, 41(8):1343–1355, Aug 1998.

- [113] A. E. Wluka, F. M. Cicuttini, and T. D. Spector. Menopause, oestrogens and arthritis. *Maturitas*, 35(3):183–199, Jun 2000.
- [114] B. M. de Klerk, D. Schiphof, F. P. Groeneveld, B. W. Koes, G. J. van Osch, J. B. van Meurs, and S. M. Bierma-Zeinstra. Limited evidence for a protective effect of unopposed oestrogen therapy for osteoarthritis of the hip: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*, 48(2):104–112, Feb 2009.
- [115] M. R. Sowers, D. McConnell, M. Jannausch, A. G. Buyuktur, M. Hochberg, and D. A. Jamadar. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 54(8):2481–2487, Aug 2006.
- [116] L. A. Castagnetta, G. Carruba, O. M. Granata, R. Stefano, M. Miele, M. Schmidt, M. Cutolo, and R. H. Straub. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 30(12):2597–2605, Dec 2003.
- [117] C. L. Tsai and T. K. Liu. Osteoarthritis in women: its relationship to estrogen and current trends. *Life Sci.*, 50(23):1737–1744, 1992.
- [118] E. R. Prossnitz, L. A. Sklar, T. I. Oprea, and J. B. Arterburn. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 29(3):116–123, Mar 2008.
- [119] E. R. Levin. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol. Endocrinol.*, 17(3):309–317, Mar 2003.
- [120] J. Lorenzo. A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J. Clin. Invest.*, 111(11):1641–1643, Jun 2003.
- [121] E. J. Filardo and P. Thomas. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol. Metab.*, 16(8):362–367, Oct 2005.
- [122] E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, H. O. Smith, T. I. Oprea, L. A. Sklar, and H. J. Hathaway. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu. Rev. Physiol.*, 70:165–190, 2008.
- [123] W. B. Pratt and D. O. Toft. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 18(3):306–360, Jun 1997.
- [124] J. L. Johnson and D. O. Toft. A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J. Biol. Chem.*, 269(40):24989–24993, Oct 1994.

- [125] S. Dauvois, R. White, and M. G. Parker. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J. Cell. Sci.*, 106(Pt 4):1377–1388, Dec 1993.
- [126] E. R. Levin. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol. Endocrinol.*, 19(8):1951–1959, Aug 2005.
- [127] M. Razandi, A. Pedram, S. T. Park, and E. R. Levin. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J. Biol. Chem.*, 278(4):2701–2712, Jan 2003.
- [128] E. R. Levin. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*, 67(6):471–475, May 2002.
- [129] E. J. Filardo, J. A. Quinn, A. R. Frackelton, and K. I. Bland. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.*, 16(1):70–84, Jan 2002.
- [130] E. J. Filardo, J. A. Quinn, K. I. Bland, and A. R. Frackelton. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.*, 14(10):1649–1660, Oct 2000.
- [131] E. R. Prossnitz, J. B. Arterburn, and L. A. Sklar. GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 265-266:138–142, Feb 2007.
- [132] E. Filardo, J. Quinn, Y. Pang, C. Graeber, S. Shaw, J. Dong, and P. Thomas. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*, 148(7):3236–3245, Jul 2007.
- [133] P. Thomas, Y. Pang, E. J. Filardo, and J. Dong. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146(2):624–632, Feb 2005.
- [134] T. Funakoshi, A. Yanai, K. Shinoda, M. M. Kawano, and Y. Mizukami. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346(3):904–910, Aug 2006.
- [135] C. Carmeci, D. A. Thompson, H. Z. Ring, U. Francke, and R. J. Weigel. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 45(3):607–617, Nov 1997.

- 
- [136] B. F. O'Dowd, T. Nguyen, A. Marchese, R. Cheng, K. R. Lynch, H. H. Heng, L. F. Kolakowski, and S. R. George. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*, 47(2):310–313, Jan 1998.
- [137] M. Maggiolini and D. Picard. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J. Endocrinol.*, 204:105–114, Feb 2010.
- [138] E. R. Prossnitz and M. Maggiolini. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 308(1-2):32–38, Sep 2009.
- [139] Y. M. Yoon, C. D. Oh, D. Y. Kim, Y. S. Lee, J. W. Park, T. L. Huh, S. S. Kang, and J. S. Chun. Epidermal growth factor negatively regulates chondrogenesis of mesenchymal cells by modulating the protein kinase C- $\alpha$ , Erk-1, and p38 MAPK signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 275(16):12353–12359, Apr 2000.
- [140] C. G. Bologa, C. M. Revankar, S. M. Young, B. S. Edwards, J. B. Arterburn, A. S. Kiselyov, M. A. Parker, S. E. Tkachenko, N. P. Savchuck, L. A. Sklar, T. I. Oprea, and E. R. Prossnitz. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat. Chem. Biol.*, 2(4):207–212, Apr 2006.
- [141] M. K. Dennis, R. Burai, C. Ramesh, W. K. Petrie, S. N. Alcon, T. K. Nayak, C. G. Bologa, A. Leitao, E. Brailoiu, E. Deliu, N. J. Dun, L. A. Sklar, H. J. Hathaway, J. B. Arterburn, T. I. Oprea, and E. R. Prossnitz. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat. Chem. Biol.*, 5(6):421–427, Jun 2009.
- [142] C. Otto, I. Fuchs, G. Kauselmann, H. Kern, B. Zevnik, P. Andreassen, G. Schwarz, H. Altmann, M. Klewer, M. Schoor, R. Vonk, and K. H. Fritzemeier. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol. Reprod.*, 80(1):34–41, Jan 2009.
- [143] C. Otto, B. Rohde-Schulz, G. Schwarz, I. Fuchs, M. Klewer, D. Brittain, G. Langer, B. Bader, K. Prella, R. Nubbemeyer, and K. H. Fritzemeier. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*, 149(10):4846–4856, Oct 2008.
- [144] E. R. Levin. G protein-coupled receptor 30: estrogen receptor or collaborator? *Endocrinology*, 150(4):1563–1565, Apr 2009.
- [145] S. E. Haynesworth, M. A. Baber, and A. I. Caplan. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, 13(1):69–80, 1992.
- [146] B. Richardson, A. Price, M. Wagner, V. Williams, P. Lorigan, S. Browne, J. G.
-



- Miller, and S. Mac Neil. Investigation of female survival benefit in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer*, 80(12):2025–2033, Aug 1999.
- [147] D. P. Lennon, J. M. Edmison, and A. I. Caplan. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J. Cell. Physiol.*, 187(3):345–355, Jun 2001.
- [148] Y. Taguchi, M. Koslowski, and D. L. Bodenner. Binding of estrogen receptor with estrogen conjugated to bovine serum albumin (BSA). *Nucl. Recept.*, 2(1):5, Aug 2004.
- [149] P. E. Stevis, D. C. Deecher, L. Suhadolnik, L. M. Mallis, and D. E. Frail. Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology*, 140(11):5455–5458, Nov 1999.
- [150] Y. Pang, J. Dong, and P. Thomas. Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. *Endocrinology*, 149(7):3410–3426, Jul 2008.
- [151] R. W. Farndale, D. J. Buttle, and A. J. Barrett. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 883(2):173–177, Sep 1986.
- [152] S. M. Hsu, L. Raine, and H. Fanger. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29(4):577–580, Apr 1981.
- [153] J.H. Peters, H. Baumgarten, and M. Schulze. Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung. *Springer-Verlag Berlin*, 1. Auflage:154–158, 209–212, 1985.
- [154] D. Somjen, Y. Weisman, Z. Mor, A. Harell, and A. M. Kaye. Regulation of proliferation of rat cartilage and bone by sex steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 40(4-6):717–723, 1991.
- [155] Y. Itagane, H. Inada, K. Fujita, and G. Isshiki. Interactions between steroid hormones and insulin-like growth factor-I in rabbit chondrocytes. *Endocrinology*, 128(3):1419–1424, Mar 1991.
- [156] S. Ab-Rahim, L. Selvaratnam, and T. Kamarul. The effect of TGF-beta1 and beta-estradiol on glycosaminoglycan and type II collagen distribution in articular chondrocyte cultures. *Cell Biol. Int.*, 32(7):841–847, Jul 2008.
- [157] M. Schmidt, C. Weidler, H. Naumann, S. Anders, J. Schölmerich, and R. H. Straub. Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes – an-

- drostenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5 $\alpha$ -reduced androgens. *Arthritis Research Therapy*, 7:R938–R948, 2005.
- [158] R. C. Kinney, Z. Schwartz, K. Week, M. K. Lotz, and B. D. Boyan. Human articular chondrocytes exhibit sexual dimorphism in their responses to 17 $\beta$ -estradiol. *Osteoarthr. Cartil.*, 13(4):330–337, Apr 2005.
- [159] R. H. Straub. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrinology*, 28:521–574, 2007.
- [160] R. A. Marklein and J. A. Burdick. Controlling stem cell fate with material design. *Adv. Mater. Weinheim*, 22(2):175–189, Jan 2010.

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

1	Zonen des hyalinen Knorpels . . . . .	8
2	Das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen . . . . .	16
3	Überblick über Estrogen-Wirkungswege . . . . .	23
4	Modell der in vitro Chondrogenese . . . . .	45
5	Darstellung der ABC-Methode . . . . .	52
6	Prinzip Sandwich ELISA . . . . .	55
7	Wirkung von $17\beta$ -Estradiol . . . . .	60
8	Wirkung von E2-BSA . . . . .	62
9	Nicht-klassische Estrogenwirkung . . . . .	65
10	Blockierung der nicht-klassischen Estrogenwirkung . . . . .	68
11	Wirkung von Estrogen bei weiblichen hMSCs . . . . .	70

### 8.2 Tabellenverzeichnis

1	Einteilung der Knorpelläsionen nach der ICRS Klassifikation . . . . .	10
2	Darstellung der sequenziellen Zugabe von $17\beta$ -Estradiol . . . . .	47
3	Darstellung der sequenziellen Zugabe von E2-BSA . . . . .	48
4	Darstellung der Zugabe von E2, E2-BSA, ICI 182.780 und G-1 zur Untersuchung nicht-klassischer Estrogeneffekte über GPR30. . . . .	48
5	Darstellung der Blockierung von GPR30 mit G15 . . . . .	49
6	Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung einer E2-Zugabe zu weiblichen hMSCs	50
9	Wirkung von $17\beta$ -Estradiol: statistische Auswertung . . . . .	100
10	Wirkung von E2-BSA: statistische Auswertung . . . . .	100
11	Nicht-klassische Estrogenwirkung über GPR30: statistische Auswertung . . . . .	101
12	Blockierung der nicht-klassischen Estrogenwirkung über GPR30: statistische Aus- wertung . . . . .	101
13	Wirkung von Estrogen bei weiblichen hMSCs: statistische Auswertung . . . . .	101

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
AR	Androgenrezeptor
BMP	Bone morphogenic protein
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinder-Serumalbumin)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CFU-F	colony forming unit-fibroblast
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dex	Dexamethason
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMEM	Dulbeccos-modifiziertes Eagle-Medium
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
E1	Estron
E2	17 $\beta$ -Estradiol
E3	Estriol
EGF	Epidermal Growth Faktor (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Faktor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
engl.	englisch
eNOS	endotheliale NO Synthase
ERE	Estrogen Responsive Element
ER	Estrogenrezeptor
Erk1/2	extracellular-signal-regulated kinases 1/2 (extrazellulär regulierte Kinasen 1/2)
FKS (FCS)	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)

G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor)
GP-ER	G-protein coupled ER1 (G-Protein gekoppelter Estrogenrezeptor 1)
GPR30	G-protein coupled receptor (G-Protein gekoppelter Rezeptor 30)
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor (Heparin-gebundener epidermaler Wachstumsfaktor)
HLA	human leukocyte antigen (menschliches Leukozytenantigen)
hMSC	humane mesenchymale Stammzelle
HSP90	Hitzeschockprotein 90
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
ICRS	International Cartilage Research Society
IGF-1	Insulin-like growth factor-1 (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
LIF	leukemia inhibitory factor (Leukämie inhibierender Faktor)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor (Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
MSC	mesenchymale Stammzelle
n	Anzahl
OCT	osteocondrale Transplantation
OPD	O-phenylenediamine dihydrochloride
PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRA	Progesteronrezeptor A
PRB	Progesteronrezeptor B
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SCF	stem cell factor (Stammzell-Faktor)
sGAG	sulfatierte Glykosaminoglykane
sog.	so genannt/e/er/es
TBS	Tris Buffered Saline
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$ (Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$ )
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein-1 (Gefäß Zelle Adhäsions-Molekül-1)
vgl.	vergleiche
ZNS	Zentrales Nervensystem

### Verwendete Einheiten

cm	Zentimeter
Da	Dalton
g	Gramm
k	kilo
l	Liter
M	Mol
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
nM	Nanomol
nm	Nanometer
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer

U/Min	Umdrehungen pro Minute
°C	Grad Celsius

## 8.4 Auswertung der biochemischen Analyse

Im Folgenden findet sich in Tabellenform eine Übersicht der Ergebnisse der biochemischen Bestimmung des Gehalts von DNA, sGAG und Kollagen Typ II.

Dargestellt sind die p-Werte (sog. Irrtumswahrscheinlichkeiten), die mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests beim statistischen Vergleich der jeweiligen Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe gewonnen wurde.

### Zu 4.1 Wirkung von $17\beta$ -Estradiol:

$17\beta$ -Estradiol	DNA-Gehalt	sGAG-Gehalt	Kollagen Typ II- Gehalt
Tag 0-7	$p = 0,190$	$p = 0,016$	$p = 0,029$
Tag 7-14	$p = 0,730$	$p = 0,190$	$p = 0,730$
Tag 14-21	$p = 0,730$	$p = 0,343$	$p = 0,629$
Tag 0-21	$p = 0,730$	$p = 0,016$	$p = 0,029$

**Tabelle 9:** Wirkung von  $17\beta$ -Estradiol: statistische Auswertung

### Zu 4.2 Wirkung von E2-BSA:

E2-BSA	DNA-Gehalt	sGAG-Gehalt	Kollagen Typ II- Gehalt
Tag 0-7	$p = 0,343$	$p = 0,257$	$p = 0,029$
Tag 7-14	$p = 1,000$	$p = 0,001$	$p = 0,029$
Tag 14-21	$p = 1,000$	$p = 0,100$	$p = 0,029$
Tag 0-21	$p = 0,343$	$p = 0,257$	$p = 0,029$

**Tabelle 10:** Wirkung von E2-BSA: statistische Auswertung

**Zu 4.3 Nicht-klassische Estrogenwirkung über GPR30:**

Zugabe	DNA-Gehalt	sGAG-Gehalt	Kollagen Typ II- Gehalt
E2	$p = 0,343$	$p = 0,029$	$p = 0,343$
E2-BSA	$p = 0,343$	$p = 0,029$	$p = 0,029$
ICI 182.780	$p = 0,343$	$p = 0,029$	$p = 0,029$
G-1	$p = 1,000$	$p = 0,029$	$p = 0,029$

**Tabelle 11:** Nicht-klassische Estrogenwirkung über GPR30: statistische Auswertung**Zu 4.4 Blockierung der nicht-klassischen Estrogenwirkung über GPR30:**

Zugabe	DNA-Gehalt	sGAG-Gehalt	Kollagen Typ II- Gehalt
E2	$p = 1,000$	$p = 0,048$	$p = 0,001$
E2+G15	$p = 1,000$	$p = 0,570$	$p = 1,000$
G-1	$p = 0,343$	$p = 0,048$	$p = 0,001$
G-1+G15	$p = 0,164$	$p = 1,000$	$p = 1,000$
G15	$p = 0,190$	$p = 0,214$	$p = 1,000$

**Tabelle 12:** Blockierung der nicht-klassischen Estrogenwirkung über GPR30: statistische Auswertung**Zu 4.5 Wirkung von Estrogen bei weiblichen hMSCs:**

Zugabe	DNA-Gehalt	sGAG-Gehalt	Kollagen Typ II- Gehalt
E210 <sup>-8</sup> M	$p = 0,662$	$p = 0,343$	$p = 0,021$
E210 <sup>-9</sup> M	$p = 1,000$	$p = 0,021$	$p = 0,189$
E210 <sup>-10</sup> M	$p = 0,662$	$p = 0,343$	$p = 1,000$
E210 <sup>-11</sup> M	$p = 1,000$	$p = 0,694$	$p = 0,345$

**Tabelle 13:** Wirkung von Estrogen bei weiblichen hMSCs: statistische Auswertung



## 9 Erklärungen

### 9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich, Marion Huber, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit 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 Arbeit erhalten, die im 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“.

---

Ort, Datum

Marion Huber

### 9.2 Erklärung zur Anregung und Überwachung der Dissertation

„Ich, Marion Huber, erkläre hiermit, dass Herr Prof. Dr. Peter Angele die vorliegende Dissertation angeregt und überwacht hat.“

---

Ort, Datum

Marion Huber

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die durch ihre Unterstützung und ihr Interesse zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Michael Nerlich danke ich, dass ich die Dissertation in seiner Abteilung für Unfallchirurgie der Universität Regensburg durchführen durfte.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Peter Angele, danke ich für die Themenstellung in einem sehr interessanten Arbeitsgebiet. Durch die vielfältigen angewendeten Methoden war es mir möglich, Einblicke in die Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten zu erhalten.

Weiter bedanke ich mich bei Herrn Dr. Thomas Dienstknecht für die Vermittlung des Themas der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Zsuzsa Jenei-Lanzl für ihre Freundlichkeit sowie die Anleitung und große Unterstützung bei der Einarbeitung in die verschiedensten Labortechniken, bei vielen technisch-praktischen Hilfestellungen und Anleitung in diverse Computerprogramme zu jeder Zeit meiner Arbeit. Ihre ständige Bereitschaft zu Gesprächen hat zum raschen Vorankommen in der experimentellen Bearbeitung des Themas beigetragen und die Arbeit in der vorliegenden Form entstehen lassen.

Weiterhin danke ich Frau Daniela Denkard und Herrn Dr. Richard Kujat für die Unterstützung bei praktischen Fragestellungen, das nette Arbeitsklima und die freundliche Aufnahme in ihr Team.

Für die Durchsicht und Mithilfe bei der Formatierung dieser Arbeit sowie für die ständige liebevolle Unterstützung und Motivation danke ich meiner Schwester Monika und Thomas Maag.

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich auf meinem Lebensweg bis hierher stets in jeder Hinsicht liebevoll unterstützt und begleitet haben.

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Marion Huber

E-Mail: die.marion.huber@gmail.com

Geburtsdatum: 02.04.1985

Geburtsort: Freising

---

### Schulbildung und Studium

1991 - 1995                      Grundschule Zolling

1995 - 2004                      Camerloher-Gymnasium Freising  
*Schulabschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife*

Oktober 2004 - September  
2005                              Studium der Mathematik und Physik auf  
Lehramt an der Universität Regensburg

Oktober 2005 – Juni 2012      Studium der Humanmedizin an der Universität  
Regensburg  
*1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Herbst 2007*  
*2. Abschnittes der Ärztlichen Prüfung Frühjahr 2012*

April 2008 – Juli 2012          Promotion am Institut für Unfallchirurgie der  
Universität Regensburg

---

### Praktisches Jahr

Februar 2011 – Mai 2011      Innere Medizin, Kantonspital Luzern; Schweiz

Juni 2011                        Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg

Juni 2011 - Oktober 2011      Neurologie , Bezirksklinikum Regensburg

Oktober 2011 – Januar 2012    Chirurgie, Krankenhaus Barmherzige Brüder,  
Regensburg

---