

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg

Direktor: Prof. Dr. med. M. Nerlich

**Der Einfluß des BMP-Antagonisten Noggin auf die
in vitro-Chondrogenese mesenchymaler
Stammzellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Norman Olbrich

2016

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg

Direktor: Prof. Dr. med. M. Nerlich

**Der Einfluß des BMP-Antagonisten Noggin auf die
in vitro-Chondrogenese mesenchymaler
Stammzellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Norman Olbrich

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Prüfer: Prof. Dr. Peter Angele

2. Prüfer: Prof. Dr. Andreas Schreyer

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Der hyaline Knorpel.....	1
1.1.1 Struktur, Aufbau und Biomechanik des hyalinen Knorpels.....	2
1.1.2 Verletzungen und Selbstheilungskapazität des Gelenkknorpels.....	5
1.1.3 Aktuelle Therapieverfahren bei Knorpeldefekten.....	5
1.2 Mesenchymale Stammzellen.....	7
1.3 Endochondrale Ossifikation und Chondrogenese von MSCs.....	9
1.3.1 Die endochondrale Ossifikation.....	10
1.3.2 Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen.....	10
1.3.3 Regulation der endochondralen Ossifikation.....	19
1.3.3.1 TGF- β und BMP.....	20
1.3.3.2 Die Signalwege von TGF- β und BMP.....	22
1.3.3.3 Die Transkriptionsfaktoren SOX9 und RunX2.....	24
1.3.3.4 Inhibition von BMP-Signaling durch den BMP-Antagonisten Noggin.....	25
1.4 Ziel der Studie.....	27
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Zellkultur.....	28
2.1.1 Gewinnung und Isolierung mesenchymaler Stammzellen.....	28
2.1.2 Zellexpansion.....	29
2.1.3 In vitro-Chondrogenese und Induktion von Hypertrophie.....	30
2.1.4 Inhibition der Hypertrophie durch Noggin.....	31
2.2 Histologie und Immunhistochemie.....	31
2.2.1 Probenentnahme und Fixierung.....	32

2.2.2 DMMB-Färbung.....	33
2.2.3 Alkalische Phosphatase-Färbung.....	33
2.2.4 Immunhistochemie.....	34
2.2.5 Mikroskopie.....	35
2.3 Aktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase im Medium.....	35
2.4 Analyse der Genexpression.....	35
2.4.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	35
2.4.2 Real Time-PCR.....	37
2.5 Statistik.....	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Histologie.....	39
3.2 Histomorphometrie.....	48
3.3 ALP-Aktivität im Mediumüberstand.....	49
3.4 Genexpressionsanalysen.....	49
4 Diskussion.....	52
4.1 Einsatz von Stammzellen in vitro.....	52
4.2 Einflußfaktoren der in vitro-Chondrogenese von MSCs.....	53
4.3 Induktion der Hypertrophie und deren Inhibition durch Noggin.....	54
4.4 Bedeutung der Ergebnisse für die MSC-Chondrogenese.....	58
5 Zusammenfassung.....	62
6 Abkürzungsverzeichnis.....	64
7 Literaturverzeichnis.....	65
8 Danksagung.....	79
9 Selbständigkeitserklärung.....	80

1 Einleitung

Knorpelschäden und die daraus resultierenden generalisierten Gelenkerkrankungen gehören heutzutage zu den am meisten verbreiteten Erkrankungen. Arthrose ist gar die häufigste Erkrankung der Gelenke weltweit (Engelhardt 2003). Gemäß einer Erhebung der World Health Organisation aus dem Jahr 2000 befanden sich Erkrankungen des Bewegungsapparates noch vor den Neoplasien auf dem dritten Platz bezüglich des Verlustes an gesunder Lebenszeit. Nicht nur ergeben sich für den einzelnen Patienten bedeutende Einschnitte durch eine erhebliche Reduktion an Lebensqualität aufgrund funktioneller Einschränkungen und fortschreitender Schmerzen, auch die Kostenträger der Volkswirtschaften werden vor immense Probleme gestellt. Die Zahlen der jährlichen Behandlungs- bzw. Folgekosten degenerativer Gelenkerkrankungen in Deutschland bewegen sich zwischen sieben (Maetzel et al., 2004) und 15 Milliarden Euro (Schewe et al., 2008).

Jedoch ist der Knorpelverschleiß kein ausschließliches Phänomen des älteren Menschen, auch immer mehr jüngere Leute sind betroffen. Während im Alter vornehmlich degenerative Ursachen aufgrund des Verlustes der biomechanischen Eigenschaften des Knorpels im Vordergrund stehen, führen bei diesen Patienten mechanische Überlastungen, Sport- oder traumatische Verletzungen zur Entstehung permanenter Knorpeldefekte, die in der Folge zu einer Degeneration des Gewebes und schließlich zur Arthrose führen (Marlovits, 2006; Freyria et al., 2012).

1.1 Der hyaline Knorpel

Im Allgemeinen können drei Formen des Knorpels im menschlichen Körper unterschieden werden: Faserknorpel, elastischer und hyaliner Knorpel. Der Faserknorpel ist ein zellarmes Gewebe ohne Perichondrium, mit vorwiegend Kollagen I neben dem knorpeltypischen Kollagen II, bestehend aus miteinander verflochtenen Kollagenfaserbündeln, die ihm besondere Zugfestigkeit verleihen und ihn widerstandsfähig selbst gegen hohe Scherkräfte machen. Dieser Knorpel kommt

beispielsweise in den Menisken und Bandscheiben vor. Der Elastische Knorpel, zu finden unter anderem in den Ohrmuscheln, Bronchien und dem Kehledeckel, ist sehr zellreich und von einem Perichondrium umgeben. Er enthält neben Kollagen auch Fibrillin und verfügt dadurch über eine sehr hohe Biege- und Druckelastizität. Der hyaline Knorpel der Gelenkflächen, der Luftröhre und der Nasenmuschel besitzt eine ausgeprägte Druckelastizität, er ermöglicht eine effektive Stoßdämpfung sowie ein nahezu reibungsfreies Gleiten der Gelenkflächen. Da sich diese Arbeit im Weiteren nur mit dieser besonderen Knorpelart beschäftigt, soll diese im folgenden Abschnitt ausführlicher beschrieben werden.

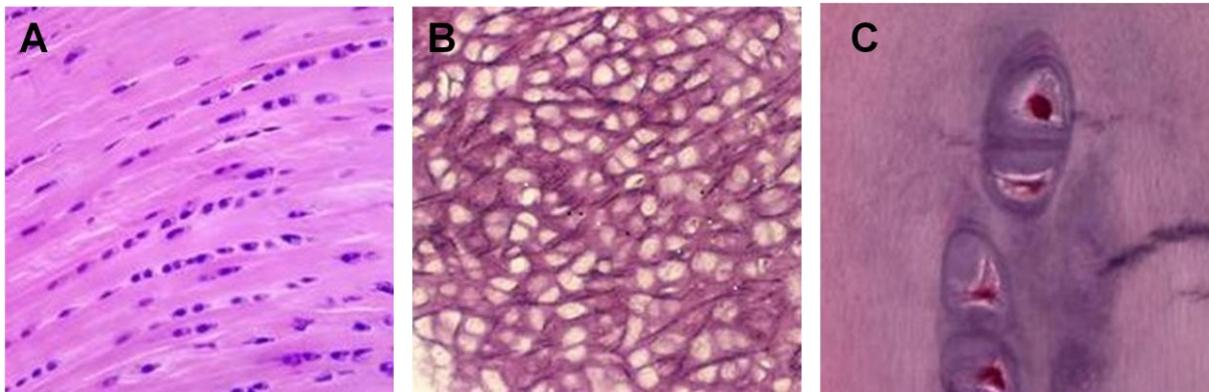


Abb. 1.1: Histologische Ansicht der drei Knorpelarten. **A** Faserknorpel. **B** Elastischer Knorpel. **C** Hyaliner Knorpel. (Bildquelle: www.knorpel.at/knorpel/aufbau-und-anatomie)

1.1.1 Struktur, Aufbau und Biomechanik des hyalinen Knorpels

Der hyaline Knorpel des erwachsenen Menschen weist einige Besonderheiten auf. So besitzt er weder Innervation noch Blutgefäße, die Versorgung erfolgt durch Diffusion aus den umliegenden Geweben (Mankin, 1982). Er besteht zum größten Teil aus Wasser, den Chondrozyten sowie der extrazellulären Matrix (EZM) (Mankin und Trasher, 1975). Im Vergleich zu anderen Geweben ist der Anteil an Zellen im hyalinen Knorpel mit 5-10% sehr niedrig (Carney, 1988). Die Chondrozyten stellen den einzigen im hyalinen Knorpel vorkommenden Zelltyp dar. Es handelt sich um nicht proliferierende Zellen, die den terminalen Differenzierungsschritt in die

Hypertrophie wie bei der endochondralen Ossifikation (s. Kap. 1.3) nicht durchmachen und deren Aufgabe Synthese, Erhaltung und Abbau der EZM ist (Bhosale, 2008; Freyria, 2011).

Die EZM besteht überwiegend aus Kollagenen, Proteoglykanen und Wasser (Marlovits, 2006). Mit ca. 90% des Gesamtkollagens macht das knorpelspezifische Kollagen II den mit Abstand größten Teil aus und bildet mit Kollagen IX und XI (ca. 10%) eine heterofibrilläre Struktur und ein typisches, quergestreiftes Muster (van der Mark, 1999; Flik et al., 2007). Kollagen I und X sind im hyalinen Knorpel kaum vertreten, wobei Typ I ausschließlich in der obersten Schicht vorkommt, die eine besondere Festigkeit gegen tangential einwirkende Kräfte aufweist (Eyre et al., 1987; Mandler et al., 1989) und Kollagen X nur in terminal differenzierenden Chondrozyten in der Übergangszone zum Knochen (Binette et al., 1998).

Zu den Proteoglykanen des Knorpels gehören die kleineren, wie Decorin und Biglycan, sowie große Proteoglykane, von denen das wichtigste das Aggrecan ist (Bhosale, 2008). Dieses besteht aus einem Kernprotein und sulfatierten Glykosaminoglykan-Seitenketten (sGAG) aus Chondroitin- und Keratansulfat, deren negative Ladung eine hohe Wasserbindungsfähigkeit verleihen. Einzelne Aggrecane können mit Hilfe eines Linkproteins an die Hyaluronsäure binden und so große Aggregate bilden (Alberts et al., 2002).

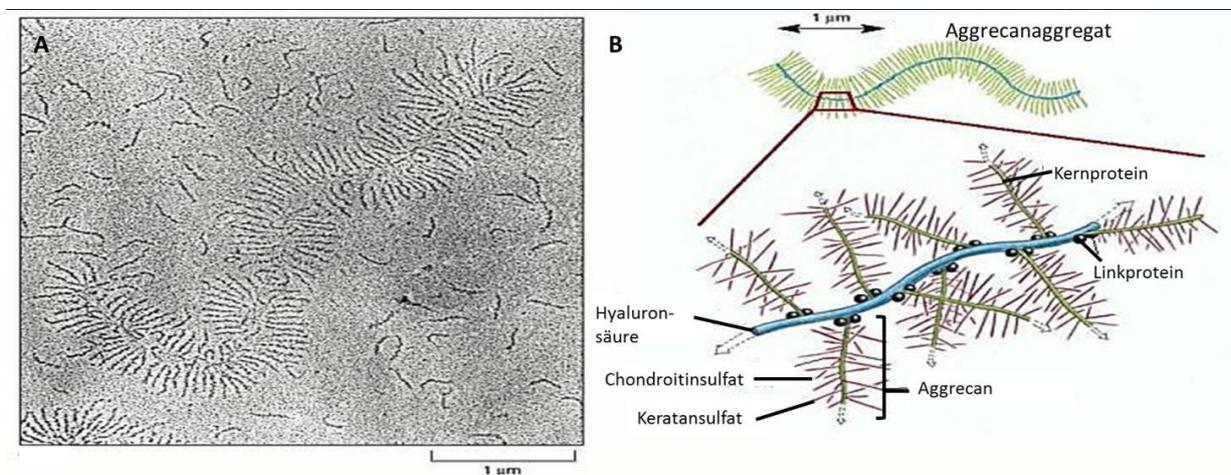


Abb. 1.2: Die Struktur der Proteoglykane. **A** Transmissionselektronisches Bild eines Aggrecan-Aggregates mit Platinkontrast. **B** Schematische Darstellung der Struktur des Aggrecan. (modifiziert nach Alberts et al., 2002)

Der Gelenkknorpel lässt sich dabei in verschiedene Zonen unterteilen: Oberflächen-, Mittel- (Transitional-) und tiefe (Radial-) Zone, sowie die calcifizierte Mineralisierungszone (Abb.1.3), die den Übergang zum Knochen bildet (Pullig et al., 2001). Dabei variiert sowohl die Zusammensetzung der EZM in Abhängigkeit zur Knorpeloberfläche (der Proteoglykangehalt nimmt mit steigender Entfernung zu, der Wassergehalt ab) als auch die Beschaffenheit und Ausrichtung der Chondrozyten. In der Oberflächenzone liegen sie mit ihrer Längsachse parallel zur Oberfläche und bilden eine dichte Matrix aus parallelen Kollagenfasern, während sie in der mittleren Zone allmählich eine eher runde Form annehmen und die Matrix deutlich unorganisierter ist. In der radialen Zone sind die Zellen dann in Säulen angeordnet, die Kollagene sind hier am dicksten und liegen senkrecht zur Oberfläche. Die hypertrophen Chondrozyten der calcifizierten Zone sind dagegen metabolisch nicht sehr aktiv, von einer weitestgehend calcifizierten Matrix umgeben und bilden große Mengen an Kollagen X (Bhosale, 2008).

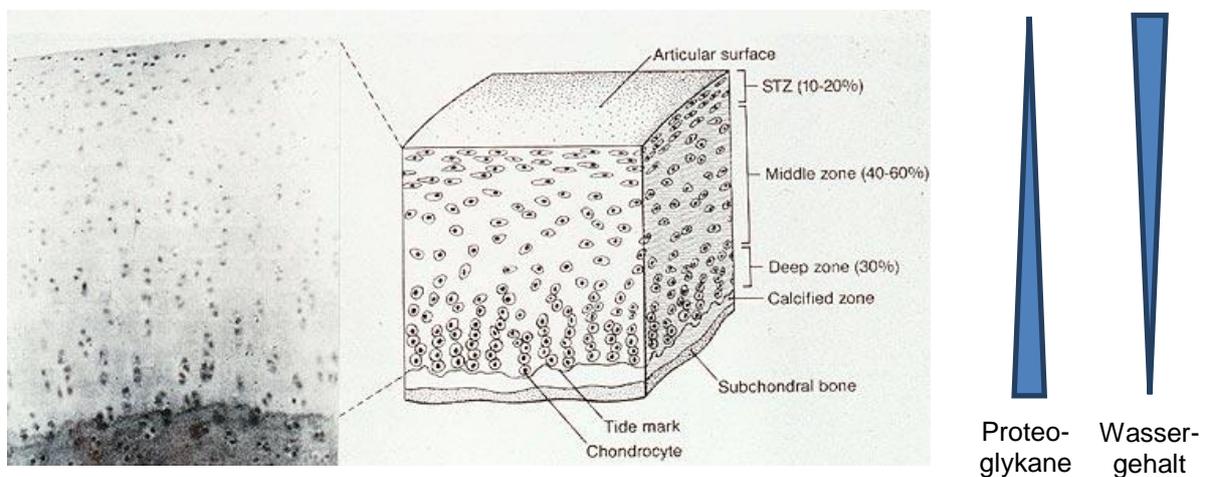


Abb. 1.3: Architektur des hyalinen Knorpels und Veränderungen in der Zusammensetzung der ECM (Bildquelle: www.sinwel.com/gots/otpstick2010/page/nehrrer01.html)

Durch seine anatomische Beschaffenheit, insbesondere den hohen Wassergehalt, ist der Gelenkknorpel in der Lage, einwirkende Kräfte bei Belastung wirksam abzdämpfen und auch einen hohen Spitzendruck auf den subchondralen Knochen zu minimieren. Außerdem ermöglicht er ein nahezu reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen (Prydz et al., 2000; Bhosale, 2008).

1.1.2 Verletzungen und Selbstheilungskapazität des Gelenkknorpels

Die Besonderheit des hyalinen Knorpels zeigt sich, wenn dieser durch pathologische Prozesse beeinträchtigt wird. Einmal verletzt, hat das Gewebe kaum mehr die Möglichkeit, spontan zu heilen (Kim et al. 1991), da adulter Gelenkknorpel nur eine sehr limitierte Fähigkeit besitzt, sich selbst zu regenerieren (Buckwalter et al. 1998). Sehr zellarm und weder innerviert noch von Blutgefäßen durchzogen, können im Falle einer Schädigung nicht in ausreichender Zahl Zellen mit chondrogenem Potential rekrutiert werden, um den Schaden zu beheben (Mackay et al., 1998; Hardingham et al., 2002). Oberflächliche Verletzungen führen zwar zu einer gesteigerten EZM-Synthese der Chondrozyten, jedoch können diese die Läsionen nicht vollständig reparieren (Buckwalter et al., 1997). Tiefergehende Schäden mit Knochenbeteiligung und Hämatombildung bewirken die Einwanderung von Stammzellen aus dem Knochenmark in das Hämatom und eine vermehrte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie TGF- β und BMP (Sledge 2001), die zwar einen Reparaturprozess einleiten, allerdings nur zu einem minderwertigen Faserknorpel führen, der der mechanischen Belastung auf Dauer nicht gewachsen ist (Buckwalter et al., 1998).

Diese geringe Fähigkeit zur Selbstregeneration stellt ein schwerwiegendes klinisches Problem dar, da unbehandelte Defekte der Gelenkflächen zur Arthrose führen können (Burr, 2004). Dabei gilt, je größer der Defekt, desto höher das Risiko einer Arthroseentwicklung (Aglietti, 2001). Gleichzeitig ist die zufrieden stellende und dauerhafte Behandlung solcher Läsionen und damit die Verhinderung der Arthrose eine der größten Herausforderungen der Orthopädie.

1.1.3 Aktuelle Therapieverfahren bei Knorpeldefekten

Zur Behandlung von Knorpelschäden stehen bereits verschiedene klinisch etablierte Methoden zur Verfügung. Eine ausschließlich konservative Behandlung wie Physiotherapie ist nur bei Kindern aufgrund der noch hochaktiven Zellpopulation in der Wachstumsfuge zu empfehlen. Bei erwachsenen Patienten ist hiermit allerdings nur eine Symptomreduktion möglich, jedoch keine ursächliche Behandlung, so daß im Erwachsenenalter meistens eine zeitnahe operative Intervention erforderlich ist

(Schewe et al., 2008). Die gewählte Operationstechnik hängt dabei maßgeblich von der Größe der Läsion ab. Die zurzeit angewendeten Techniken sind:

Refixation: Eine Möglichkeit bei frischen Verletzungen ist die Refixation mit biodegradablen Pins. Diese ist jedoch nur erfolgversprechend, wenn das ausgebrochene Fragment eine ausreichend große knöcherne Rückfläche besitzt, welche die Einheilung begünstigt. Weist der Knorpel Prellmarken auf oder handelt es sich um rein chondrale Flakes, sollte eine andere Therapiemethode in Betracht gezogen werden (Schewe et al., 2008).

Knochenmarkstimulation: Sogenannte „tissue response“-Techniken wie die Mikrofrakturierung (Steadman et al., 1997) können bei Verletzungen bis 2 cm² Größe versucht werden. Hierbei wird die subchondrale Knochenlamelle eröffnet, was zum Austritt von mesenchymalen Stammzellen in das Hämatom und zur Bildung eines Fibringerinnsels mit nachfolgender Entstehung von Ersatzknorpel führt, der in seinen Eigenschaften allerdings eher dem Faserknorpel gleicht, also nicht in der Lage ist, die biomechanischen Aufgaben des Gelenkknorpels zu erfüllen (Bhosale et al. 2008). In neuerer Zeit werden mit Matrixapplikation kombinierte Stimulationstechniken versucht (autologe matrixinduzierte Chondrogenese, AMIC), über die Qualität der Ergebnisse ist jedoch noch nicht viel bekannt (Benthin, 2010).

Osteochondrale Transplantation: Bei der sog. „Mosaikplastik“ werden osteochondrale Zylinder, die vorher aus nicht belasteten Gelenkregionen entnommen wurden, in Presspassung in den Defekt eingebracht,. Da die maximale Anzahl der Zylinder durch die Fläche der geeigneten Entnahmebereiche allerdings begrenzt ist, kommt diese Methode vor allem bei der Behandlung von Defekten bis 4 cm² zum Einsatz (Outerbridge et. al, 2000; Angele et al., 2005).

Autologe Chondrozytentransplantation: Die Methode der Wahl bei Defekten >4 cm² ist die ACT (Angele et al., 2005). Hierbei wird arthroskopisch eine Biopsie aus dem Knorpel eines gesunden, wenig belasteten Bereiches entnommen, die Chondrozyten enzymatisch aus der ECM herausgelöst und für zwei bis drei Wochen in Monolayerkulturen expandiert. Bei ausreichender Zellzahl wird die Zellsuspension dann unter einen über den Defekt genähten Periostlappen gespritzt (Brittberg et al., 1994; Marlovits et al., 2006). Heutzutage wird dabei die trägerassoziierte ACT, bei der die Zellen vor Einbringung in den Defekt in biokompatibeln Trägern vorkultiviert werden, favorisiert, da diese technisch weniger aufwendig und komplikationsärmer ist (Schewe et al., 2008).

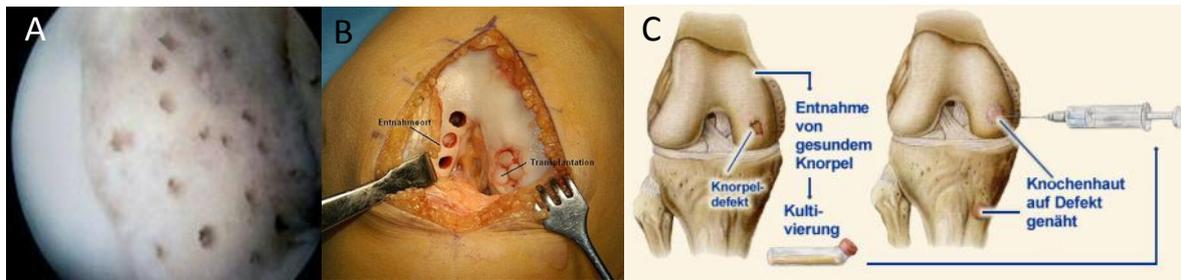


Abb. 1.4: Chirurg. Verfahren der Knorpelsanierung. **A** Mikrofrakturierung. **B** Mosaikplastik. **C** Autologe Chondrozytentransplantation (A medicine-informations.com; B praxisclarahof.ch; C lengerke.de)

Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß die ACT den anderen Methoden in Bezug auf Langzeitergebnisse und Transplantatversagen überlegen ist, da deren Knorpelregenerat dem hyalinen Knorpel histologisch und biomechanisch sehr nahe kommt (Schewe et al., 2008). Trotzdem bietet keines der genannten Verfahren die Möglichkeit, ein funktionell hochwertiges hyalines Knorpelgewebe zu generieren und damit eine dauerhafte Beschwerdefreiheit bei den Patienten zu gewährleisten. Zudem ist die Verwendung von Chondrozyten aufgrund sehr geringer Zellzahlen in der Biopsie und begrenzter Proliferationsfähigkeit zumindest problematisch (Cancedda et al., 2003) und das Setzen neuer Defekte durch Entnahme aus gesunden Arealen bietet ständig neuen Diskussionsstoff (Jubel et al., 2002; Hangody et al., 2003). Daher rückte in den letzten Jahren das Gebiet des „Tissue Engineering“ mehr und mehr in den Vordergrund, zu dessen zentralen Zielen die künstliche Produktion von Geweben *in vitro* gehört – aus körpereigenen Substanzen und ohne Schädigung gesunder Regionen. Hier fiel das Augenmerk besonders auf den Einsatz der mesenchymalen Stammzellen, da deren Potential zur Selbsterneuerung theoretisch eine unbegrenzte Versorgung mit Spendermaterial verspricht (Heng et al., 2004).

1.2 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind aufgrund ihrer Fähigkeiten und verhältnismäßig einfachen Isolationsmöglichkeit vielversprechende Kandidaten für Tissue Engineering und therapeutische Anwendungen (Müller, 2008; Kolf et al., 2007). MSCs sind Zellen mit vergleichbaren Eigenschaften wie embryonale

Stammzellen, deren klinischer Einsatz jedoch keine ethischen oder moralischen Konflikte auslöst (Tuan et al., 2002). Es handelt sich um multipotente Zellen, d.h. Zellen, die in der Lage sind, in verschiedene mesenchymale Zelllinien zu differenzieren (Caplan, 2005). Weiterhin können sich diese Zellen durch die ständige Produktion identischer Tochterzellen selbst erneuern (Tuan et al., 2002), wobei allerdings sowohl die Selbsterneuerungs-, als auch die Proliferationsfähigkeit mit steigendem Lebensalter deutlich abnehmen (Heng et al., 2004).

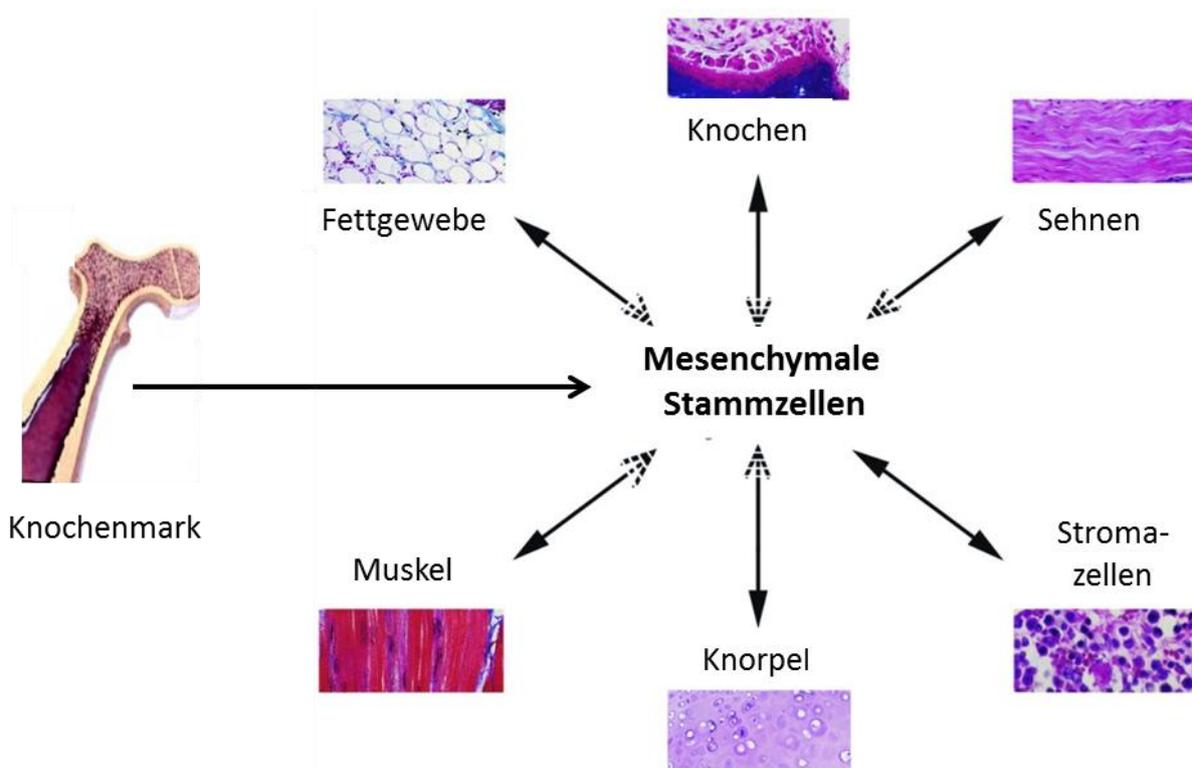


Abb. 1.5: Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen. In Abhängigkeit der einwirkenden Faktoren sind die im Knochenmark gebildeten MSCs in der Lage, in verschiedenste Zelllinien zu differenzieren, wie z.B. Knochen, Knorpel, Fettgewebe u.a. Die bidirektionalen Pfeile beschreiben dabei die Fähigkeit bereits differenzierter Stammzellen, unter bestimmten Voraussetzungen wieder zu dedifferenzieren bzw. in andere Zelllinien zu transdifferenzieren. Darüber hinaus können sich mesenchymale Stammzellen durch die Bildung identischer Tochterzellen selbst erneuern (Abb. modifiziert nach Chen & Tuan 2008).

Die Gewinnung von MSCs kann aus unterschiedlichen Geweben erfolgen, zum Beispiel aus Fettgewebe (Zuk, 2001), Blut (Bieback et al., 2004) oder Muskeln (Nathanson, 1986). Die gebräuchlichste Methode ist heute jedoch die Entnahme aus dem Knochenmark durch eine Punktion des Beckenkammes, welche aufgrund des

insgesamt geringen Eingriffes zum einen die Möglichkeit der ambulanten Durchführung bietet, zum anderen gesundes Gewebe verschont wird, da im Gegensatz zur Knorpelzelltransplantation auf das Eröffnen von Gelenken verzichtet werden kann (Pittenger, 1999).

1.3 Endochondrale Ossifikation und Chondrogenese von MSCs

Die Entwicklung des Knorpelgewebes, die Chondrogenese, ist ein komplexer Prozess, der während der Embryogenese entweder zum dauerhaften hyalinen Knorpel der Gelenke oder während der endochondralen Ossifikation über ein zeitweiliges Knorpelgerüst zur Entwicklung des Skelettsystems führt (Tacchetti et al., 1992; Goldring et al., 2006).

Einen Überblick über die einzelnen Phasen der Chondrogenese gibt Abb. 1.6.

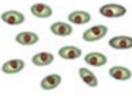
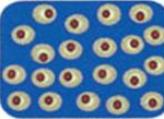
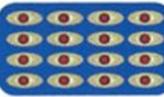
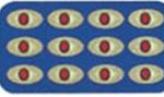
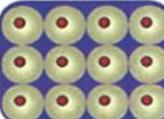
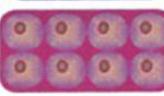
Differenzierungsstadium	Histologisches Bild	ECM-Marker	Regulatorische Marker
Mesenchymale Stammzelle		Kollagen Typ I	SOX9, RUNX2, CBFA1
Prächondrozyt		N-CAM, Tenascin (Kollagen Typ II)	SOX9 (SOX5, SOX6)
Früher Chondroblast		Kollagen II, Aggrecan, Link Protein	SOX5, SOX6, SOX9
Säulenförmiger Chondroblast		Kollagen II, Aggrecan, Link	SOX5, SOX6, SOX9
Prähypertropher Chondroblast		Kollagen II, Aggrecan, Link Protein (Kollagen X)	RUNX2, RUNX3, PTHrP, IHH, CBFA1
Hypertropher Chondrozyt		Kollagen Typ X	RUNX2, RUNX3, VEGF, CBFA1
Terminaler Chondrozyt		Mmp-13, Osteopontin, ALP	RUNX2, CBFA1

Abb. 1.6: Darstellung der Chondrogenesephasen mit wichtigen Matrixproteinen und regulatorischen Markern (modifiziert nach Lefebvre & Smits, 2005)

1.3.1 Die endochondrale Ossifikation

Die endochondrale Ossifikation führt im Rahmen der Embryogenese zur Entwicklung der langen Röhrenknochen. Laut Lefebvre & Smits (2005, Abb. 1.6) durchlaufen die mesenchymalen Zellen unterschiedliche Stadien, an deren Ende die Entstehung des Knochens aus einem vorübergehenden Knorpelgerüst steht. Zuerst kondensieren die Zellen unter der Einwirkung von Zelladhäsionsmolekülen wie z.B. N-Cadherin (Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktion), N-CAM (Zell-Zell-Adhäsion) und Matrixmoleküle wie Tenascin C. Im Zentrum dieser Kondensation entstehen Prächondrozyten, die die Marker undifferenzierter Zellen verlieren und mit der Synthese von Kollagen II beginnen. Es folgt die Weiterentwicklung zu frühen Chondroblasten, die verstärkt Kollagen II sekretieren, sowie weitere Matrixbestandteile wie Aggrecan, Link Protein und Kollagen IX und XI. Die Zellform ändert sich von rund zu eher abgeflacht, die Zellen ordnen sich, gestützt von einem dreidimensionalen kollagenen Matrixgerüst, säulenförmig an und die Proliferationsrate nimmt mehr und mehr ab. Von zentraler Bedeutung für den Ablauf der Chondrogenese bis zu dieser Differenzierungsphase ist die Expression der Transkriptionsfaktoren L-SOX5 und SOX6 und SOX9 (s. Abschnitt 1.3.3.3).

Im Anschluss an diese Proliferationsphasen durchwandern die Chondrozyten eine Zwischenstufe (prähypertropher Chondrozyt) bevor sie schließlich eine letzte dramatische phänotypische Änderung erfahren. Während der hypertrophen Differenzierung kommt es zu einer Zunahme des Zellvolumens um ungefähr das Zehnfache, zu einer Aktivierung hypertrophiespezifischer Gene sowie zu einer veränderten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, bevor während der terminalen Differenzierung die Zellen apoptotisch werden und das Knorpelgerüst durch Knochen ersetzt wird.

Diese äußerst komplexe Entwicklung unterliegt multiplen systemischen und lokalen Einflüssen. Während das systemisch wirksame Wachstumshormon (GH, Growth Hormon) noch an der Proliferation der Chondrozyten beteiligt ist, ist bei der hypertrophen Differenzierung das Schilddrüsenhormon ein anderer entscheidender systemischer Regulator. Insbesondere das auch in den hier durchgeführten Versuchen verwendete Trijodthyronin T3 ist ein potenter Stimulator der Hypertrophie und damit des Skelettwachstums. Dies zeigt sich u.a. daran, daß bei einer hypothyreotischen Stoffwechsellage die Wachstumsfuge verdünnt und das

Wachstum der langen Röhrenknochen verlangsamt ist (Ballock et al., 1994; Nilsson et al., 2005; Mackie et al., 2008).

Als lokal sezernierter, extrazellulärer Faktor ist z.B. IGF-1 (Insulin-like growth factor) ein Mediator für die örtliche Wirkung von GH auf den wachsenden Knorpel. Andere lokal wirksame Faktoren sind Fibroblast Growth Hormon (FGF), Indian Hedgehog (Ihh) und im Besonderen die Bone morphogenetic proteins (BMPs) und Transforming growth factor- β (TGF- β), die im Rahmen der Regulation der endochondralen Ossifikation vorgestellt werden sollen (s. Kap. 1.3.3).

Während die ersten chondrogenen Differenzierungsschritte noch von v.a. SOX9 beeinflusst werden, steuern nach Induktion der Hypertrophie die Transkriptionsfaktoren RUNX2 und RUNX3 den weiteren Weg zur terminalen Differenzierung (s. Kap. 1.3.3.3).

Im Rahmen der sich ändernden hormonellen Einflüsse sowie durch die beträchtliche Größenzunahme der Chondrozyten kommt es außerdem zwangsläufig zu einer Veränderung der extrazellulären Matrix. Während der hypertrophen Differenzierung wird die Expression des für den Erhalt des chondrozytären Phänotyps notwendigen Kollagen Typ II herunterreguliert, dafür können in diesem Stadium charakteristisch hohe Konzentrationen von Kollagen Typ X gefunden werden. Gleichzeitig beginnt der selektive Abbau der transversalen Kollagenstreben der die Zellen umgebenden Matrix, während die vertikalen bestehen bleiben, da sie später den Rahmen für die Einwanderung der Osteoblasten bilden. Diese Entwicklung bzw. in erster Linie der Abbau der Transversalstreben ist eine Grundvoraussetzung für die morphologischen Änderungen während der terminalen Differenzierung und wird vor allem gesteuert durch die von den hypertrophen Zellen exprimierte Matrix Metalloproteinase-13 (Mmp-13), außerdem können jetzt Osteopontin, Wachstumsfaktoren für Blutgefäße (VEGF, vascular endothelial growth factor) sowie alkalische Phosphatase (ALP), die essentiell für die Mineralisation der Matrix ist, in selbiger nachgewiesen werden. Diese veränderte Umgebung führt die hypertrophen Zellen schlussendlich in die terminale Differenzierung, während der die Zellen apoptotisch werden, entlang der vertikalen Kollagenstreben Blutgefäße und Osteoblasten einwandern und das Knorpelgerüst durch Knochen ersetzt wird (Ballock et al., 1994; Anderson, 1995; Ballock et al., 2003; Goldring et al., 2006; Mackie et al., 2008).

Eine Besonderheit stellt dagegen die Entwicklung der artikulären Chondrozyten im Rahmen der embryonalen Gelenkentwicklung dar (s. Abb. 1.7 bis 1.9). Sobald die Gelenkregionen im Embryo festgelegt sind, entsteht auf jeder Seite des zukünftigen Gelenkes eine sogenannte Interzone mit erhöhter Zelldichte. Zwischen diesen zwei Kondensationszentren kommt es dann zur Hohlraumbildung indem sich dort befindliche Prächondrozyten zu Stammzellen zurückbilden und apoptotisch werden (Archer et al., 2003). Die Prächondrozyten, die der neugebildeten Höhle anliegen, differenzieren zu frühen Chondroblasten, entgehen aber dem normalen Weg der endochondralen Ossifikation und differenzieren stattdessen im weiteren Verlauf zu artikulären Chondroblasten. Nach Abschluss der postnatalen Entwicklung differenzieren diese weiter zu artikulären Chondrozyten, die ein Leben lang die Oberfläche der Gelenke erhalten. Sie sind gekennzeichnet durch eine geringe Proliferationsrate und die Expression knorpelspezifischer Markergene wie Aggrecan, Kollagen II und Lubricin sowie die lebenslange Expression von SOX5, 6 und 9 (Davies et al., 2002; Lefebvre et al., 2005; Rhee et al., 2005).

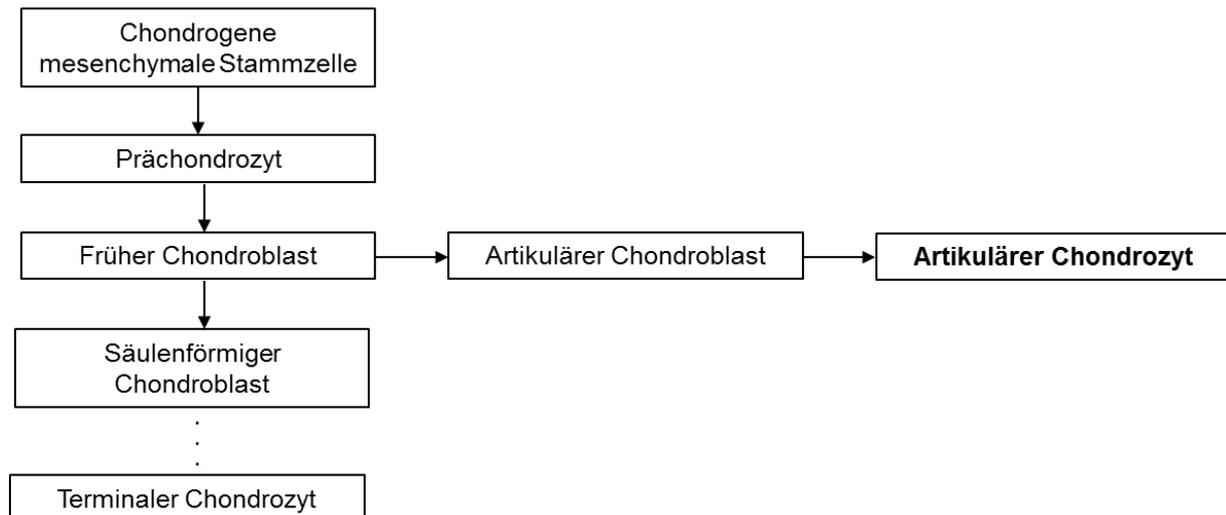


Abb. 1.7: Der „Sonderweg“ der artikulären Chondrozyten. Während der embryonalen Entwicklung der späteren Gelenkregionen verlassen die angrenzenden Chondroblasten den normalen Weg der endochondralen Ossifikation und differenzieren zu artikulären Chondrozyten, die die knorpelige Oberfläche der Gelenke bilden (modifiziert nach Lefebvre & Smits, 2005)

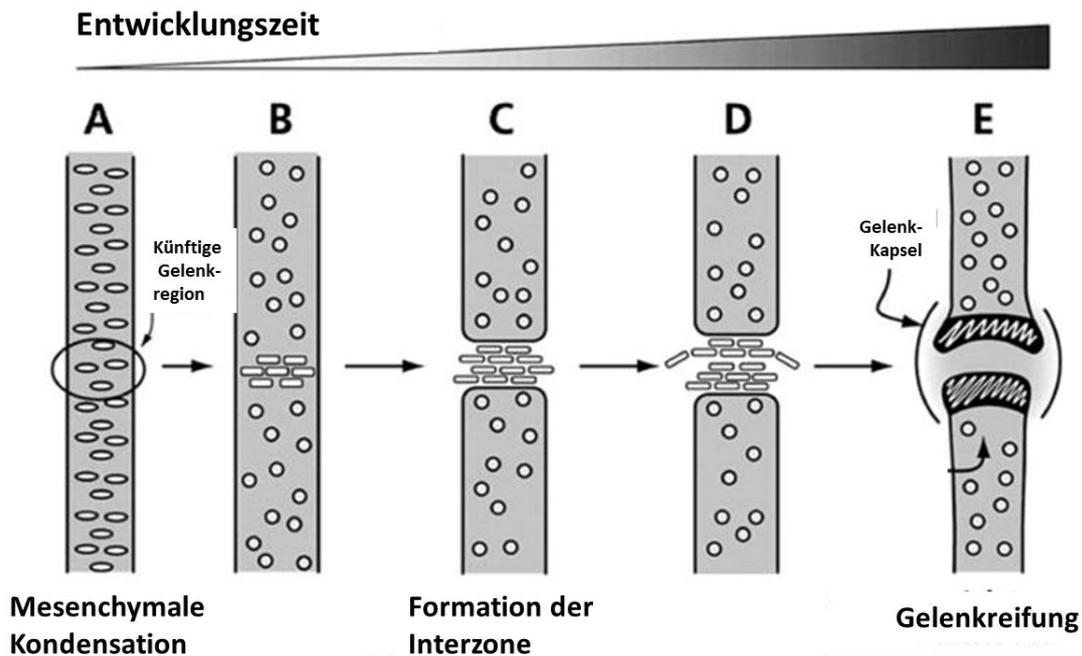


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Gelenkentwicklung. Nachdem bisher unbekannte Regulationsmechanismen die Gelenkregionen in der embryonalen Gliedmaßenknospe festgelegt haben, kommt es zu einer Kondensation mesenchymaler Stammzellen (A,B). Bald darauf kann die Interzone bereits als kompakte, senkrecht zur Achse der langen Röhrenknochen ausgerichtete Struktur ausgemacht werden (C), von der in der weiteren Entwicklung die Bildung der dreidimensionalen Gelenkstruktur ausgeht, bis schlussendlich das reife Gelenk mit all seinen Bestandteilen, wie Knorpel und Kapsel, entstanden ist (D,E). (Modifiziert nach Pacifici et al., 2006).

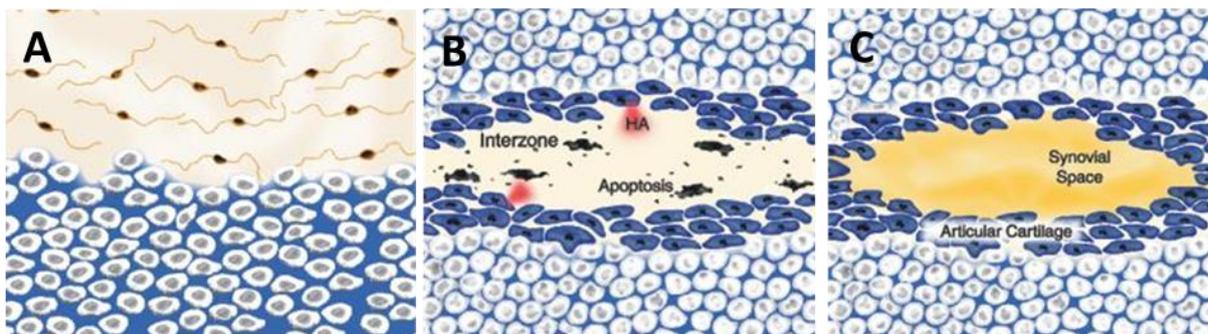


Abb. 1.9: Nach der Bildung früher Knorpelzellen aus undifferenziertem Mesenchym (A, Kap. 1.3.1) teilt sich diese Knorpelmasse im Bereich des späteren Gelenkes in zwei Hälften und es kommt jeweils zur Bildung einer Interzone. In Anwesenheit von Hyaluronsäure (HA) erweitert sich der Interzellularraum durch Dissoziation der in der Interzone befindlichen Chondrozyten. Diese werden schließlich apoptotisch und es kommt zur Bildung eines Hohlraumes (B), der sich mit Flüssigkeit füllt und so einen ersten, primitiven Gelenkraum bildet. Aus dem Rest der Interzone entsteht dann im weiteren Verlauf der Gelenkreifung der artikuläre Knorpel (Bildquelle A-C: <https://www.rndsystems.com/resources/articles/growthdifferentiation-factor-5>).

Dabei ist aktuell noch kaum etwas über den genauen Ursprung der artikulären Chondrozyten bzw. die beteiligten genetischen Faktoren bekannt, die zu diesem Sonderweg in der Entwicklung führen und Pacifici et al. (2006) stellen daher richtigerweise fest, daß dieser Vorgang weit komplexer scheint, als bisher angenommen. Gleichzeitig liefern sie allerdings auch die bis dato beste Antwort auf die Frage, wie diese Entwicklung vorstättengeht. Sie injizierten einen fluoreszierenden Farbstoff an mehreren Stellen im Bereich der künftigen Gelenkregionen im Hühnerembryo und beobachteten das Verhalten dieser so markierten Zellen im zeitlichen Verlauf. Dabei stellten sie fest, daß die unmittelbar an die Gelenkregion angrenzenden Zellen in das sich entwickelnde Gelenk einwandern, Teil der Interzone werden und schließlich unter anderem in der epiphysären Gelenkschicht sowie in der Gelenkkapsel gefunden werden und somit direkt an der Gelenkentwicklung beteiligt sind. Bei genauerer Untersuchung dieser Zellen in vitro präsentierten diese sich in der Tat als chondrogen und differenzierten später weiter zu Chondrozyten. Interessant hierbei ist außerdem, daß andere Zellen, die lediglich wenige hundert Mikrometer entfernt waren, zwar dieselbe Mobilität besitzen und überall im Mesenchym der sich entwickelnden Extremität gefunden werden können, bereits diese Zellen jedoch schon nicht mehr in der Interzone nachweisbar waren (Abb. 1.10). Dies zeigt, daß sowohl die künftigen artikulären Chondrozyten, die die Interzone und das spätere Gelenk bilden, als auch die Mikroumgebung, in der sie sich befinden und die ihre Entwicklung stimuliert, beide sehr speziell sein müssen. Ein detailliertes Verständnis dieses Prozesses könnte von großem Nutzen bezüglich eventueller zellbasierter Knorpelersatztherapien sein (Pacifici et al, 2006).

Artikuläre Chondrozyten erhalten ihren Differenzierungsstatus und werden niemals hypertroph, daher ist es nicht überraschend, daß RUNX2 in gesundem Gelenkknorpel nicht exprimiert wird (Kuboki et al., 2003). Lediglich in der Tidemark, der dünnen Grenzschicht zwischen Knorpel und der kalzifizierten Zone bzw. dem subchondralen Knochen (s. Abb. 1.3), finden sich hypertrophe Zellen, die Kollagen Typ X und RUNX2 exprimieren und die Mineralisation der Matrix induzieren. Verschiedene Studien haben außerdem gezeigt, daß im Rahmen pathologischer Prozesse wie Arthrose artikuläre Chondrozyten in die Hypertrophie und die terminale Differenzierung gehen können und dann auch hypertrophiespezifische Gene nachgewiesen werden können. Das lässt vermuten, daß der artikuläre Differenzierungsstatus zwar normalerweise permanent, aber keineswegs terminal ist.

(Girkontaite et al., 1996; Kuboki et al., 2003; Wang et al., 2004; Lefebvre et al., 2005).

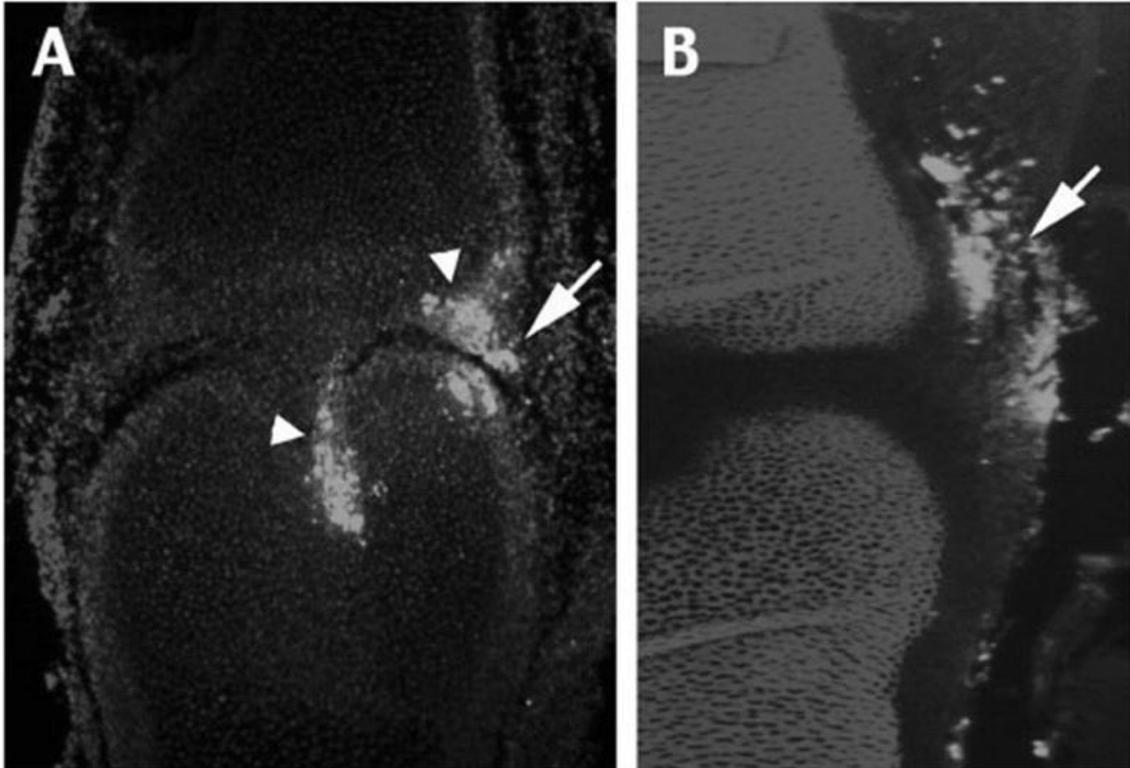


Abb. 1.10: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Hühnerembryogelenkes. Der fluoreszierende Farbstoff wurde in die unmittelbare Gelenkumgebung eines sechseinhalb Tage alten Embryos injiziert (A, langer Pfeil) bzw. ca. 0,3 mm hiervon entfernt (B, langer Pfeil), die Untersuchung erfolgte nach 48 Stunden Inkubationszeit. Die in A markierten Zellen scheinen in das sich entwickelnde Gelenk eingewandert zu sein (Pfeilspitzen), während die Zellen in B zwar ebenfalls gewandert sind, hier jedoch nicht intraartikulär zu finden sind, obwohl deren Injektionsort nur minimal von jenem in A entfernt lag (nach Pacifici et al., 2006).

1.3.2 Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen

Die autologe Chondrozytentransplantation ist derzeit das Mittel der Wahl bei größeren Knorpeldefekten, auf die dennoch bestehende Problematik bzw. die Einschränkungen dieser Methode wurde jedoch bereits hingewiesen (s. Kap. 1.1.3). Die reimplantierten Zellen sind zwar durchaus in der Lage, in vivo längerfristig stabile Knorpelkonstrukte zu bilden, bei der in vitro-Kultivierung allerdings kommt es häufig

zum Verlust dieser Fähigkeit und zur Dedifferenzierung der Zellen, außerdem kann aufgrund der deutlich reduzierten Proliferationsfähigkeit artikulärer Chondrozyten keine ausreichende Zellexpansion und somit keine ausreichende Zellzahl erreicht werden, um auch großflächige Defekte der Gelenkknorpel therapieren zu können (Dell'Accio et al, 2001; De Bari et al., 2004). Diese Schwierigkeiten bei der Zellkultivierung können durch die Verwendung mesenchymaler Stammzellen teilweise umgangen werden, da diese Zellen im Gegensatz zu bereits ausgereiften Chondrozyten eine erhöhte Proliferationsfähigkeit besitzen, so daß hier adäquate Zellzahlen generiert werden können. Darüber hinaus sind die aus dem Knochenmark gewonnenen MSCs frühe, undifferenzierte Vorläuferzellen, welche noch nicht von eventuellen genetischen Vorprogrammierungen beeinflusst sein dürften, denen z.B. die Zellen während der Chondrogenese in der Gliedmaßenentwicklung unterliegen (Sekiya et al., 2001).

Das chondrogene Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen wurde 1980 zunächst von Owen beschrieben (Ashton et. al, 1980), bevor die Entwicklung verschiedener in vitro-Systeme in der Folgezeit die genauere Untersuchung der chondrogenen Differenzierung adulter MSCs sowie die hierauf einwirkenden Faktoren ermöglichte. Im klinischen und experimentellen Einsatz finden sich heute matrixfreie Pellet- bzw. Aggregatkulturen sowie matrixbasierte Systeme, die biologische oder synthetische Polymere (z.B. Kollagen, Glykosaminoglykane, Alginat, Hyaluronsäure, Polyglykolsäure, Polymilchsäure u.a.) als Trägermaterialien (Scaffolds) für Chondrozyten und MSCs verwenden (Bonaventure et al., 1994; Johnstone et al., 1998; Wakitani et al., 1998; Angele et al., 1999; Solchaga et. al; 1999; Radice et al., 2000; Hunziker, 2001; Nöth et al., 2002; Tuli et al., 2003; Ichinose et al., 2005; Matsuda et al., 2005; Mehlhorn et al., 2006; Jakobsen et al., 2010; Diekmann et al., 2010; Frisch et al., 2015). Diese Systeme haben im allgemeinen einen dreidimensionalen Charakter, was dabei von besonderer Bedeutung ist, da hierdurch eine hohe Zelldichte sowie zahlreiche Zell-Zell-Kontakte gegeben sind, was als Voraussetzung für die Chondrogenese der mesenchymalen Stammzellen in vitro beschrieben wird (Tuli et. al, 2003).

Das klassische in vitro-Chondrogenesemodell wurde 1998 von Johnstone und Yoo zuerst für Kaninchenstammzellen etabliert und später für humane MSCs modifiziert (Johnstone und Yoo et al., 1998; Yoo und Johnstone et al., 1998). In diesem Modell differenzieren MSCs nach einer zweiwöchigen Proliferationsphase in einem mit

fetalem Kälberserum (FBS) versetzten Nährmedium chondrogen in einer Pellet- bzw. Aggregatkultur mit einem definierten Differenzierungsmedium, welches Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie TGF- β , Insulin, Ascorbinsäure, Pyruvat und Dexamethason enthält. Dieses Medium ist im Gegensatz zum Proliferationsmedium serumfrei, da in FBS-haltigem Differenzierungsmedium inkubierte Zellen keine Aggregate formen und zur weiteren Analyse nicht verwendet werden können (Johnstone et al., 1998). Bereits in vorhergehenden in vitro-Versuchen mit Chondrozyten stellte sich FBS als starkes Mitogen heraus, welches auch die terminale Differenzierung induziert und beschleunigt (Bruckner et al., 1989; Böhme et al., 1992).

Das Modell an sich hat den Vorteil, dass die Kulturbedingungen präzise definiert werden können, insbesondere ist es frei von den komplexen, in vivo einwirkenden Einflüssen (Sekiya et al., 2001). Der klassische Wachstumsfaktor für das Differenzierungsmedium ist TGF- β , dessen Unterformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 die bisher einzigen etablierten Induktoren der Chondrogenese sind (Mackay et al., 1998; Barry et al., 2001). Dabei wird TGF- β 3 bei einigen Autoren das größte chondrogene Potential zugeschrieben, hier zeigte sich eine schnellere chondrogene Differenzierung der Zellen, andere Studien hingegen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen TGF- β -Formen feststellen (Barry et al., 2001; Müller et al., 2010; Freyria et al., 2012). TGF- β allein induziert dosisabhängig die Chondrogenese in den Aggregaten, in Kombination mit Dexamethason nehmen die Aggregate dabei noch an Größe zu, die Zellen entwickeln einen chondrogenen Phänotyp und es sind Synthese bzw. Genexpression von Kollagen Typ II und anderen spezifisch chondrogenen Markern nachweisbar (Johnstone et al., 1998; Yoo et al., 1998; Barry et al., 2001).

Obwohl z.B. die bone morphogenetic proteins (BMPs) ebenfalls als Induktoren der Chondrogenese beschrieben wurden (Schmitt et al., 2003; Estes et al., 2006), konnte dies an anderer Stelle nicht bestätigt werden (Winter et al., 2003; Indrawattana et al., 2004). Anstatt die Chondrogenese zu induzieren, scheinen die BMPs diese lediglich zu fördern, wenn sie gemeinsam mit dem Induktor TGF- β verwendet werden (Boeuf et al., 2010). Neben weiteren Modulatoren der MSC-Chondrogenese wie beispielsweise FGF und IGF (siehe hierzu Kap. 1.3.3.1), beeinflussen auch Umweltfaktoren wie mechanische Stimulation oder Hypoxie den Prozess der Chondrogenese (Potier et al., 2010; Khan et al., 2010; Boeuf et al., 2010).

Es hat sich allerdings herausgestellt, dass während der Chondrogenese *in vitro* neben der Induktion chondrogener Marker auch hypertrophieassoziierte Gene wie Kollagen X, MMP-13, vaskuloendothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und alkalischer Phosphatase exprimiert werden (Johnstone et al., 1998; Yoo et al., 1998; Sekiya et al., 2002; Mwale et al., 2006; Pelttari et al., 2006; Johnstone et al., 2013). Bei einigen Autoren erfolgt dabei der Anstieg der Genexpression von Kollagen Typ X derart schnell, daß hier Zweifel an der Verwendung als *in vitro*-Hypertrophiemarker geäußert werden (Mwale et al., 2006). Dennoch lassen diese Beobachtungen vermuten, dass die Chondrogenese der mesenchymalen Stammzellen *in vitro* in den momentan verwendeten Kulturbedingungen nicht in dem für artikuläre Chondrozyten typischen Differenzierungsstadium stehenbleibt, sondern denselben regulatorischen Mechanismen und Entwicklungsphasen folgt, wie sie während der embryonalen Skelettentwicklung in der endochondralen Ossifikation gefunden werden (Müller et al., 2008; Müller et al., 2010).

In Abhängigkeit des Differenzierungsstatus der mesenchymalen Stammzellen kommt es nach ektopter Implantation von MSC-basierten Knorpelkonstrukten *in vivo* ebenfalls zu Entwicklungen, die mit der endochondralen Ossifikation korrelieren. Implantierte, bereits differenzierte Zellen dedifferenzieren entweder oder es zeigen sich Matrixverkalkungen, Gefäßneubildungen und teilweise Mikroossifikationen, bei der Implantation von undifferenzierten MSCs sind Fibrogenese, die Bildung heterotoper Gewebe sowie Verkalkungen dieser Zellen beschrieben. Derartige Veränderungen wurden bei der Implantation artikulärer Chondrozyten nicht beobachtet, diese bildeten stabilen Knorpel (Dell'Accio et al., 2003; De Bari et al., 2004; Pelttari et al., 2006; Boeuf et al., 2010).

In den folgenden Versuchen wurde ein modifiziertes *in vitro*-Chondrogenesemodell verwendet, in dem die hypertrophe Differenzierung der Stammzellen durch den Entzug von TGF- β und Dexamethason und die Zugabe von Schilddrüsenhormon T3 induziert werden kann (Abb. 1.11). T3 fördert die Hypertrophie während TGF- β und Dexamethason selbige hemmen (Mackay et al., 1998; Müller et al., 2008; Müller et al., 2010). Unter diesen Bedingungen entwickelt sich ein hypertropher Phänotyp und es kommt zur Hochregulierung hypertrophiespezifischer Marker wie Kollagen Typ X und MMP-13 sowie einer erhöhten Aktivität der alkalischen Phosphatase (Müller et al., 2008).

Da sich MSCs in vitro wie erwähnt ähnlich den Wachstumsfugenchondrozyten verhalten und weiter Richtung Hypertrophie und terminale Differenzierung entwickeln bietet dieses Kultursystem eine gute Möglichkeit zur Untersuchung von Faktoren, die diese Hypertrophie beeinflussen und möglicherweise inhibieren können (Müller et al., 2008).

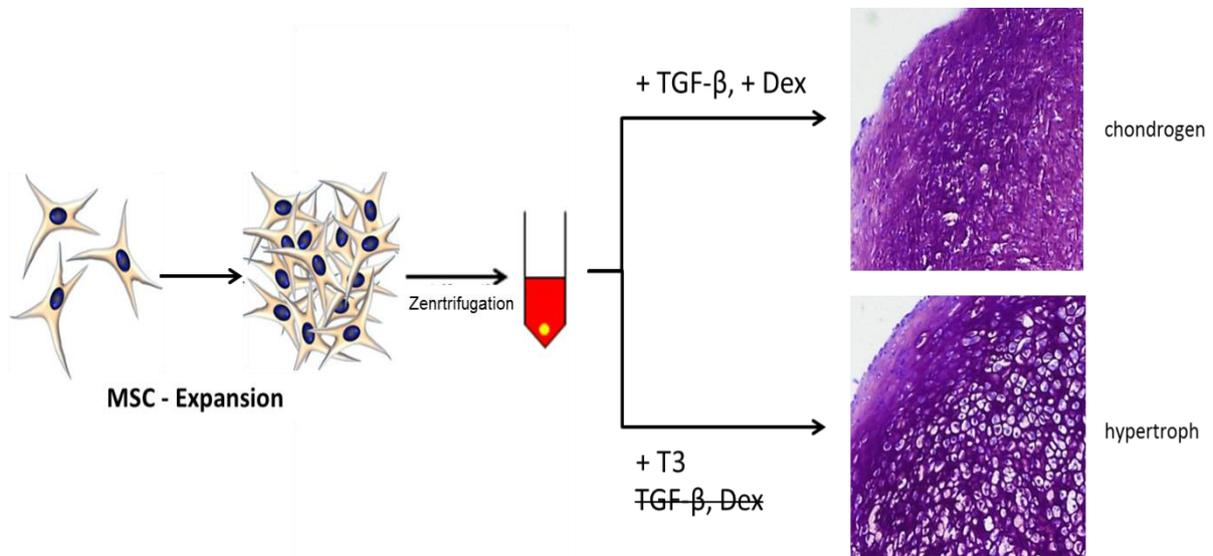


Abb. 1.11: Das modifizierte in-vitro-Chondrogenesemodell nach Johnstone. Nach einer zweiwöchigen Proliferationsphase differenzieren die MSCs in einem definierten Medium unter Zugabe von TGF-β 3 und Dexamethason chondrogen, durch Entzug beider Faktoren sowie die Zugabe von T3 kann in den Zellen jedoch auch eine hypertrophe Differenzierung induziert werden.

Dieses Modell wurde auch in den hier durchgeführten Experimenten verwendet (Eigene Darstellung).

1.3.3 Die Regulation der endochondralen Ossifikation

Die Induktion und Regulation von Chondrogenese und endochondraler Ossifikation hängt von der koordinierten Aktivität vieler Faktoren ab. Neben anderen Regulationsmechanismen und Regelkreisen sind die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und Transforming Growth Factor β (TGF-β) die beiden wichtigsten Protagonisten im Zusammenspiel dieser komplexen Signalwege (Abb. 1.12).

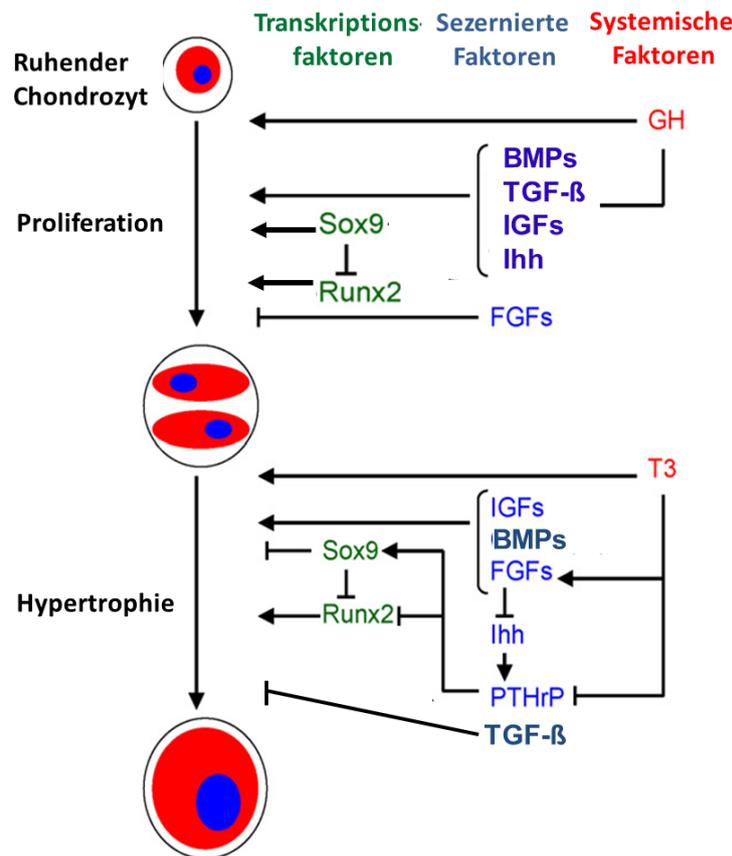


Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Rolle der systemischen, lokal sezernierten und der Transkriptionsfaktoren, die die Proliferation der Chondrozyten bis zur Hypertrophie während der endochondralen Ossifikation fördern (Pfeile) bzw. inhibieren. Der Einfachheit halber sind hier nur die im Text erwähnten Faktoren aufgeführt. (modifiziert nach Mackie et al., 2007).

1.3.3.1 TGF- β und BMP

Die BMPs und TGF- β -Isoformen sind Untergruppen der sogenannten TGF- β -Superfamilie, die außerdem noch weitere Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren enthält, die allesamt Schlüsselrollen während der normalen Entwicklungs- und Wachstumsphasen einnehmen (Kingsley, 1994; Hogan, 1996). Während beide noch den nötigen Stimulus für die Konversion von MSCs in die chondrogene Differenzierung darstellen, beeinflussen BMPs und TGF- β die terminale Differenzierung der Chondrozyten gegensätzlich durch Interaktion mit unterschiedlichen Rezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen (Freyria et al., 2012).

Die Bone Morphogenetic Proteins wurden ursprünglich identifiziert als Moleküle, die vor allem die ektopische Knorpel- und Knochenentwicklung in den sogenannten „Soft Tissues“ induzieren (De Luca et al., 2001; Goldring et al., 2006). Weiterführende Forschungen haben gezeigt, daß die Familie der BMPs aus einer großen Anzahl von Mitgliedern, inklusive Mitgliedern der Growth and Differentiation Factors (GDF) - Subfamilie, besteht, die an der Entwicklung verschiedener Gewebearten durch unterschiedliche biologische Aktivität beteiligt sind, wobei eine eindeutige Verteilung der einzelnen Proteine in den jeweiligen Geweben, sowie eine Koexpression einiger BMPs zu beobachten ist (Tsumaki et al., 2002). Bei der endochondralen Ossifikation und der Entwicklung der langen Röhrenknochen wird vermutet, daß BMP 2, 4 und 7 eine entscheidende Rolle spielen, allerdings werden auch BMP 5 und 6 gefunden, wobei die Expression der einzelnen BMPs über den gesamten Verlauf der endochondralen Ossifikation bestimmten zeitlichen und räumlichen Mustern folgt (Zhang et al., 2002; Goldring et al., 2006). So ist die BMP-Signalgebung bereits für die mesenchymale Kondensation der Stammzellen nötig, BMP 2, 3, 4, 5 und 7 werden in erster Linie im Perichondrium gefunden. In proliferierenden Chondrozyten wird zum Beispiel nur BMP7 gefunden, während BMP6 (gemeinsam mit BMP2) die terminale Differenzierung fördert und ausschließlich in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird (Minina et al., 2002; Zhang et al., 2002; Tsumaki et al., 2002; Yoon and Lyons, 2004; Goldring et al., 2006). In der eigenen Arbeitsgruppe wurde unter anderem die Bedeutung von BMP4 auf die Chondrogenese der MSCs im oben beschriebenen in vitro-Chondrogenesemodell untersucht. Dabei konnte unter Hypertrophie induzierenden Bedingungen zum einen eine signifikante BMP4-Hochregulation festgestellt werden, die in erster Linie durch das Schilddrüsenhormon T3 hervorgerufen wurde. Zum anderen konnte beobachtet werden, daß die Zugabe von BMP4 zum chondrogenen Medium, welches noch TGF- β und Dexamethason enthält, keinen Einfluß auf die Zellen hatte, während im hypertrophen Medium auch nach Entzug des eigentlich hierin enthaltenen, Hypertrophie fördernden T3, ein hypertropher Phänotyp entstand, der sogar noch deutlicher ausgeprägt war, als im reinen, nur T3 enthaltenden Medium. Dies unterstreicht die Rolle von BMP4 als starkem Regulator der hypertrophen Differenzierung (Karl A., 2013).

Wie wichtig der Einfluss der BMPs auf die Skelettentwicklung ist, zeigen auch andere in vitro- und in vivo-Versuche, die in die normalen Expressionsmuster eingreifen. Die

Zugabe von BMPs zum Kulturmedium führt in anderen Arbeiten zu äußerst hohen Leveln der hypertrophiespezifischen Marker Kollagen Typ X und ALP und einer schnelleren Reifung der Chondrozyten sowie reduzierter Expression von Kollagen Typ II in vitro (Volk et al., 1998; Grimsrud et al., 1999). Die Überexpression von BMP4 in vivo resultiert in einem überschießenden Knorpelwachstum, insbesondere in einer deutlichen Verdickung der Zone der hypertrophen Chondrozyten, was auf eine gesteigerte bzw. beschleunigte Differenzierung der Zellen schließen lässt (Tsumaki et al., 2002), während die Ausschaltung von BMP2 und BMP4 zu Defekten während der Mesodermbildung und zu früher embryonaler Letalität führt (Pathi et al., 1999; Reddi, 2001).

TGF- β ist der zweite Schlüsselregulator in der Chondrogenese. Hier sind mehrere Isoformen bekannt, von denen TGF- β 3 in einigen Studien das höchste chondrogene Potential zugeschrieben wurde und dies hier zu einer schnelleren Differenzierung geführt hat (Barry et al., 2001; Freyria et al., 2012), während in anderen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen einzelnen TGF- β -Formen gefunden werden konnten (Müller et al., 2010). Wie die BMPs stellt TGF- β den initialen Stimulus für die Konversion der MSCs in die chondrogene Linie dar (Freyria et al., 2012), es weisen also beide einen synergistischen, fördernden Effekt in den frühen Stadien der Chondrogenese auf. Während BMP jedoch dann die terminale Differenzierung bis hin zur Knochenentstehung fördert, inhibiert TGF- β diese und hält die Chondrozyten in ihrem prähypertrophen Zustand, was schließlich auch zum Erhalt des artikulären Phänotyps führt (Yang et al., 2001). In verschiedenen Zellkulturmodellen wurde außerdem gezeigt, daß auch die Expression hypertrophiespezifischer Gene wie Kollagen Typ X, Alkalische Phosphatase und MMP13 unter dem Einfluß von TGF- β inhibiert ist (Li et al., 2006).

1.3.3.2 Die Signalwege von TGF- β und BMPs

Die Signalkaskade der TGF- β Superfamilie wird auf verschiedenen Ebenen kontrolliert und läuft über spezifische Rezeptoren, rezeptorassoziierte Signalproteine und Transkriptionsfaktoren ab.

BMPs und TGF- β übermitteln ihre Signale über membranständige, heterodimere Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, die eine intrazelluläre Serin/Threonin-Kinaseaktivität

aufweisen. Dabei erfolgt die Aktivierung der Typ-I-Rezeptoren, die auch als Activin Receptor-like Kinase (ALK) bezeichnet werden, entweder direkt oder indirekt über Bindung an Typ-II-Rezeptoren und nachfolgende Phosphorylierung. BMP bindet spezifisch an ALK2, 3 und 6, die TGF- β -Signale werden hauptsächlich über ALK5 übertragen. Die aktivierten Typ-I-Rezeptoren interagieren dann mit den jeweiligen spezifischen Smads (Merino et al., 1999; Li et al., 2005).

Smads sind eine Familie intrazellulärer Proteine, die aus drei Klassen von Signalmolekülen bestehen: den Rezeptor-assoziierten Smads (1, 5 und 8 für die BMPs, 2 und 3 für TGF- β), die durch Bindung an den Typ-I-Rezeptoren phosphoryliert und damit aktiviert werden, den inhibitorischen Smads6 und 7, die diese Aktivierung unterbinden können, sowie dem Co-Faktor Smad4, der einen zentralen Vermittler für sowohl BMPs als auch TGF- β darstellt und nach der Phosphorylierung Komplexe mit den Rezeptor-assoziierten Smads bildet. Diese Komplexe dringen in den Nukleus ein und beeinflussen bzw. regulieren die Transkription der Zielgene (Yang et al., 2001; Yoon und Lyons, 2004; Li et al., 2005; Li et al., 2006), vor allem RUNX2 und Sox9. Daneben gibt es einen Smad-unabhängigen Signaltransduktionsweg, bei dem nach Bindung der Liganden an den Rezeptor sogenannte MAP-Kinasen (mitogen-activated protein) aktiviert werden, die dann im Zellkern Einfluss auf die Genexpression nehmen. Die Aspekte dieses Signalweges in Chondrozyten sind allerdings noch unklar (Yoon und Lyons, 2004).

Die ganze Komplexität des BMP-Systems wird deutlich, wenn man die Vernetzung mit anderen Wachstumsfaktorsystemen betrachtet, von denen hier zwei beispielhaft kurz genannt werden sollen. Eine wichtige Interaktion besteht mit dem Indian Hedgehog (Ihh)/Parathyroid hormon-related Protein (PTHrP)- Signalweg. Dieser reguliert sich selbst über eine negative Rückkopplung und inhibiert die hypertrophe Differenzierung. Ihh hält die Expression der BMPs aufrecht, was für eine positive Rückkopplung zwischen beiden Regelkreisen spricht und reguliert außerdem die Expression von PTHrP in den periartikulären Regionen, dessen lokal begrenzte Signale die Entfernung von der Gelenkregion bestimmen, in der Chondrozyten von proliferierenden zu differenzierenden Zellen werden und somit eine hypertrophe Differenzierung stattfindet (Minina et al., 2002; Yoon und Lyons, 2004).

FGF-Signaling (Fibroblast Growth Factor) mit einer Vielzahl verschiedener Signalmoleküle sowie mehreren Rezeptortypen beeinflusst die Geschwindigkeit der Chondrozytendifferenzierung in Abhängigkeit von der Entwicklungsphase des

Embryos, es induziert den Beginn der hypertrophen Differenzierung und beschleunigt den Differenzierungsprozess als solchen, unter anderem durch eine negative Einflussnahme auf die *Ihh*-Expression. Die Balance zwischen FGF und BMP passt die Geschwindigkeit der hypertrophen Differenzierung der Proliferationsrate an. (Minina et al., 2002).

Das Zusammenspiel und Gleichgewicht dieser und weiterer Regelkreise ist wichtig für einen geregelten Ablauf der Chondrogenese.

1.3.3.3 Die Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2

Im Rahmen der Chondrogenese spielen zwei Transkriptionsfaktoren im Zellkern eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung und Reifung der Chondrozyten – RunX2 und Sox9.

Der Transkriptionsfaktor RunX2 ist ein Ziel des BMP-Signalweges, dessen Expression direkt durch die BMPs hochreguliert werden kann. Gemeinsam mit seinem engen Verwandten RunX3 fördert er die Proliferation und hypertrophe Differenzierung. Während er in chondrogenen Stammzellen noch vorkommt, wird er in Chondroblasten nicht mehr exprimiert, jedoch reaktiviert, wenn diese hypertroph differenzieren und kann dann bis zur terminalen Differenzierung nachgewiesen werden. So ist es nicht verwunderlich, daß RunX2 in gesundem Gelenkknorpel nicht gefunden wird, jedoch durchaus im Rahmen der Pathologie bei Arthrose. Daß RunX2 eine essentielle Rolle bei der Skelettentwicklung zukommt wurde deutlich, als herausgefunden wurde, daß eine Haploinsuffizienz für RunX2 zu Cleidocranialer Dysplasie beim Menschen führt und RunX2-Knockoutmäuse überhaupt keine Knochen bilden (Tuan et al., 2002; Lefevbre und Smits, 2005; Li et al., 2005; Phimphilai et al., 2006).

Der Transkriptionsfaktor Sox9 ist einer der frühesten Marker, der in kondensierenden Zellen nachgewiesen werden kann. Seine Expression ist der auslösende Trigger für MSCs zu kondensieren und chondrogen zu differenzieren - kein anderer Faktor hat einen vergleichbaren Einfluß auf die Entwicklung und den Erhalt des knorpeligen Phänotyps – und in Prächondrozyten und Chondroblasten bleibt sie auf einem hohen Level bestehen (Tuan et al., 2002; Lefevbre und Smits, 2005; Goldring et al., 2006). In diesem Stadium findet sich außerdem eine Koexpression mit zwei weiteren, in den

Kondensationsarealen noch nicht vorkommenden Mitgliedern der Sox-Familie, L-Sox5 und Sox6. Ikeda (2004) bezeichnete diese drei Faktoren als „Master Chondrogenic Trio“, nachdem gezeigt wurde, daß das Zusammenspiel aller drei Faktoren für eine ausreichende Expression von knorpelspezifischen Markerproteinen wie Kollagen Typ II und Aggrecan, sowie für die Aufrechterhaltung des chondrogenen Status notwendig ist. Weiterhin ist dieses Trio in der Lage, die Expression hypertrophiespezifischer Gene zu unterdrücken. Sox9 wird herunterreguliert, sobald die Zellen in die Prähypertrophie übergehen (Lefebvre und Smits, 2005). Versuche, in denen die Gene für L-Sox5 und Sox6 ausgeschaltet wurden, zeigten die Entwicklung schwerer Chondrodysplasien, die Inaktivierung von Sox9 in Mausembryos in Zellen, die Kollagen Typ II exprimieren, führte zwar noch zur Kondensation der MSCs, die Prächondrozyten waren aber nicht mehr in der Lage, weiter chondrogen zu differenzieren (Smits et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Chimal-Monroy et al., 2003). Die Expression aller Sox-Gene wird sowohl von TGF- β , als auch von den BMPs induziert (Chimal-Monroy et al., 2003).

1.3.3.4 Inhibition von BMP-Signaling durch den BMP-Antagonisten Noggin

BMP-Signaling kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Zum einen intrazellulär durch die schon erwähnten inhibitorischen Smads, sowie durch den zellständigen Pseudorezeptor BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor), der in seinem extrazellulären Aufbau den Typ-I-Rezeptoren der TGF- β -Superfamilie stark ähnelt, jedoch eine veränderte intrazelluläre Domäne besitzt, die keine enzymatische Aktivität aufweist und so die Weiterleitung sowohl von TGF- β -, als auch von BMP-Signaling blockiert (Lin et al., 2008). Zum anderen existieren verschiedene extrazelluläre Antagonisten wie Follistatin, Gremlin, Chordin und Noggin, die die BMPs mit unterschiedlicher Affinität binden und deren Interaktion mit ihren Rezeptoren verhindern (Tardif et al., 2004). In dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluß der Antagonist Noggin auf die Chondrogenese der mesenchymalen Stammzellen *in vitro* hat.

Das Polypeptid Noggin wird während der Embryogenese von „Spemanns Organisator“ produziert und findet sich bei Säugetieren im Neuralrohr, der Chorda dorsalis und später auch während der Knorpelentwicklung (Nifuji et al., 1999; Reddi,

2001). Noggin war der erste identifizierte Antagonist der Bone morphogenetic proteins (Marcelino et al., 2001) und indem es die Effekte der BMPs antagonistisch reguliert, nimmt es entscheidenden Einfluß auf die Form und Größe des sich entwickelnden knorpeligen Skeletts während der endochondralen Ossifikation, es verringert die Bildung von Osteoblasten und inhibiert die Ossifikation und späteren Schritte der Chondrogenese (Merino et al., 1999; Tardif et al., 2004). Die Einwirkung von Noggin ist essentiell für die korrekte Differenzierung des Neuralrohres sowie die Formation der Sklerotome, der medioventralen Anteile der embryonalen Ursegmente, aus denen sich später die Elemente des Achsenskelettes entwickeln (Brunet et al., 1998; McMahon et al., 1998). Verschiedene Studien haben dabei gezeigt, daß Noggin sehr spezifisch mit BMP2 und BMP4 (in geringerem Maße auch mit BMP7) interagiert und Komplexe bildet, die dann die Bindung der BMPs an ihre Rezeptoren blockieren (Zimmermann et al., 1996; Lim et al., 2000; Rifas, 2007). Bei in vivo Versuchen mit Mäusen führte die Überexpression von Noggin zum Fehlen großer Anteile des knorpeligen Skelettes, was darauf schließen läßt, daß die Entwicklung des Knorpels in entscheidendem Maße von den BMPs abhängt, diese aber durch die Anwesenheit von Noggin suffizient unterdrückt werden können (Tsumaki et al., 2002).

1.4 Ziel der Studie

Mesenchymale Stammzellen stellen eine vielversprechende Quelle für die Entwicklung körpereigener Ersatzprodukte dar, mit denen auch größere lokalisierte Knorpelschäden minimalinvasiv behandelt werden könnten, ohne Immun- oder Abstoßungsreaktionen auszulösen. Allerdings stellt das biologische Verhalten chondrogen differenzierender MSCs deren Eignung für die klinische Anwendung derzeit noch in Frage. Während der Chondrogenese durchlaufen die MSCs dieselben typischen Stadien, wie sie während der endochondralen Ossifikation in der Embryogenese gefunden werden, was vermuten lässt, daß ähnliche Einflußfaktoren an beiden biologischen Prozessen beteiligt sind. Bisher existiert jedoch noch keine Möglichkeit, die Hypertrophie während der MSC-Chondrogenese in vitro dauerhaft zu unterbinden und den artikulären Phänotyp zu stabilisieren, was zwingende Voraussetzung für einen therapeutischen Einsatz in vivo ist. Das Chondrogenesemodell, in dem die Hypertrophie reproduzierbar verstärkt werden kann, bietet gute Voraussetzungen, die Biologie dieses Prozesses zu untersuchen und besser zu verstehen.

Eine Möglichkeit, in die terminale Differenzierung der MSCs einzugreifen, besteht in der Modulation des die Hypertrophie induzierenden BMP-Signalings. Das Augenmerk dieser Arbeit lag dabei auf dem BMP-Antagonisten Noggin. Dabei soll untersucht werden, welche Auswirkungen die Behandlung mit verschiedenen Nogginkonzentrationen auf die chondrogene und besonders die hypertrophe Differenzierung, sowie die Genexpression der MSCs in vitro hat.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

In der Kultur verwendete Medien:

Proliferationsmedium:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (Gibco Invitrogen, Deutschland) versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (PAN Biotech GmbH) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco Invitrogen)

Differenzierungsmedium:

Chondrogenes Medium:

- DMEM high glucose (Gibco Invitrogen)
- + 1% ITS+3 (Sigma Aldrich)
- + 50 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma Aldrich)
- + 100 nm Dexamethason (Sigma Aldrich)
- + 1 mM Natriumpyruvat (Sigma Aldrich)
- + 40 µg/ml L-Prolin (Sigma Aldrich)
- + 10 ng/ml TGF-β1 (R&D Systems)

Hypertrophes Medium:

- DMEM high glucose (Gibco Invitrogen)
- + 1% ITS+3 (Sigma Aldrich)
- + 50 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma Aldrich)
- + 1 mM Natriumpyruvat (Sigma Aldrich)
- + 40 µg/ml L-Prolin (Sigma Aldrich)
- + 1nM Trijodthyronin (Sigma Aldrich)

2.1.1 Gewinnung und Isolierung von mesenchymalen Stammzellen

Für die durchgeführten Experimente wurden humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark des Beckenkammes männlicher Patienten im Alter zwischen

20 und 40 Jahren verwendet, die ihnen während Beckenkammspanoperationen entnommen wurden. Die unterschriebene Einverständniserklärung der Patienten sowie die Genehmigung der Ethikkommission lagen vor. Um die Stammzellen aus dem Knochenmark zu isolieren, wurde ein Ficoll-Gradient verwendet. Das entnommene Knochenmark wurde ca. 1:5 mit Proliferationsmedium vermischt und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen auf die vorbereitete Ficoll-Lösung aufgetragen. Nach Zentrifugation der Röhrchen bei 1680 U/min für 35 Minuten, die zu einer Trennung der Knochenmarksbestandteile nach dem Dichtegradienten führte (Abb.2.1), konnte die die MSCs (Dichte 1,077 g/ml) beinhaltende milchige Phase abpipettiert, mit frischem Proliferationsmedium vermischt und erneut bei 1000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert werden. Dann wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Proliferationsmedium aufgenommen und die Zellen ausgezählt.

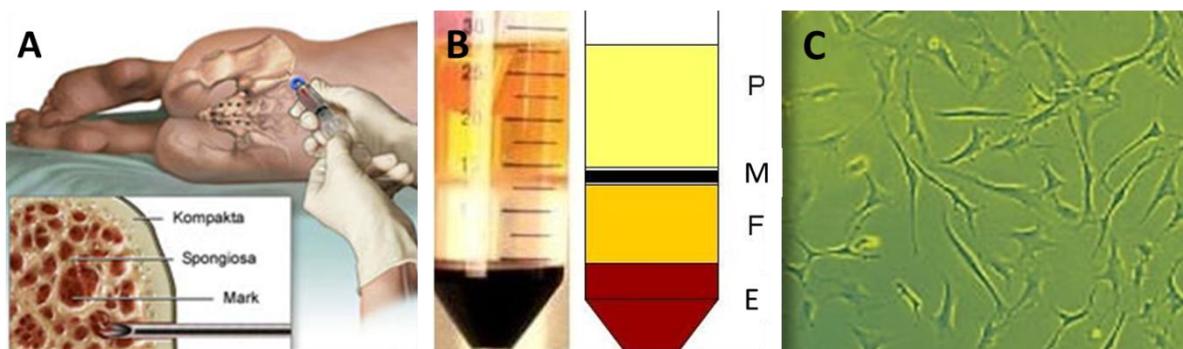


Abb. 2.1: Gewinnung von hMSCs. **A:** Knochenmarksentnahme durch Beckenkampnpunktion. **B:** Phasentrennung bei Ficoll-Gradient (P=Plasma; M=Mononukleäre Zellen; F=Ficoll; R=Erythrozyten, Thrombozyten). **C:** adhärenente MSCs in der Zellkulturflasche (Bildquellen: **A** www.onkologie-traunstein.de; **B** prbmondor.aphp.fr; **C** www.provitro.de)

2.1.2 Zellexpansion

Danach wurden je ca. 2 Millionen Zellen in Proliferationsmedium in 75 cm² Zellkulturflaschen ausplattiert, ca. 4 Wochen bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt inkubiert und bis zu 80%-iger Konfluenz expandiert, es erfolgte zweimal wöchentlich Mediumwechsel. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert und für spätere Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Versuche dieser Arbeit wurden Zellen der Passage zwei verwendet.

2.1.3 In vitro-Chondrogenese und Induktion von Hypertrophie

Für die Chondrogenese wurden die MSCs aufgetaut und in 75 cm² Zellkulturflaschen in Proliferationsmedium ausgebracht und für ca. 10 Tage bzw. bis zum Erreichen der Konfluenz expandiert.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen einmal mit sterilem Dulbeccos PBS (PAA, Österreich) gespült und dann durch Zugabe von 3 ml Trypsin (PAN Biotech GmbH) sowie vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflasche vom Boden abgelöst. Die Wirkung des Trypsin wurde danach durch Zugabe von 6 ml Proliferationsmedium gestoppt, die Zellsuspension bei 1000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet nach Absaugen des Überstandes in Differenzierungsmedium ohne Zusätze resuspendiert. Nachfolgend wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau (Sigma Aldrich) vermischt und in der Kammer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 U/min abzentrifugiert und anschließend das Medium abgesaugt.

In den durchgeführten Versuchen wurde das von Johnstone et. al (1998) etablierte Chondrogenese-Modell verwendet. Dementsprechend wurden die Zellen in chondrogenem Differenzierungsmedium mit Zusätzen, wie oben beschrieben, aufgenommen und in V-Boden 96-Well-Platten (Nalge Nunc Int. Corp., Rochester, NY, USA) mit einer Zellzahl von ca. 200.000 Zellen in 300 µl pro Well ausgesät und anschließend bei 2000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Die Platten wurden bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Die entstandenen Pellets, nachfolgend „Aggregate“ genannt, wurden für 14 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium mit Zusätzen prädifferentiiert, anschließend wurde ein Teil der Aggregate für weitere 14 Tage in chondrogenem Medium belassen, ein anderer Teil wurde in hypertrophes Medium mit Zusätzen überführt. Dreimal wöchentlich wurde das Medium gewechselt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aggregate bzw. Mediumüberstände für histologische und immunhistochemische Untersuchungen bzw. für die Bestimmung der Genexpression ausgewählter Gene aus den einzelnen Bedingungen entnommen. Dies wird bei den entsprechenden Verfahren genauer beschrieben. Nach 28 Tagen endete ein Versuch.

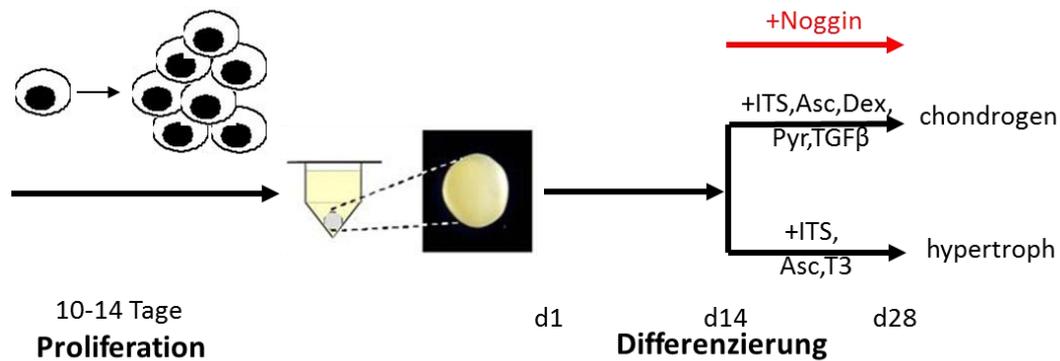


Abb. 2.2: Versuchsaufbau. Nach 10 -14d Expansion der Zellen in Proliferationsmedium wurden die Zellen in ein Pelletkultursystem überführt und 14d chondrogen vordifferenziert. Dann verblieb ein Teil der Aggregate für weitere 14d in chondrogenem, während der andere in hypertrophes Medium überführt wurde. In beiden Bedingungen wurden neben der Kontrollgruppe auch Gruppen mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von Noggin behandelt (eigene Darstellung).

2.1.4 Inhibition der Hypertrophie durch Noggin

Für die Dosis-Wirkungsversuche wurden, wie beschrieben, Aggregate gebildet und für 14 Tage in chondrogenem Medium vordifferenziert. An Tag 14 wurde ein Teil der Aggregate in chondrogenem Medium belassen, der andere in hypertrophes Medium überführt. Dabei wurden in beiden Bedingungen Gruppen mit jeweils verschiedenen Konzentrationen von Noggin (R&D Systems, Minneapolis, USA) behandelt (10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml). Gleichzeitig wurden jeweils Aggregate im entsprechenden Standardmedium ohne Nogginzugabe als Kontrolle belassen.

2.2 Histologie und Immunhistochemie

Verwendete Puffer und Lösungen

TRIS-Puffer 0,2M

24,2 g TRIS Base

mit HCl auf pH 7,0 einstellen

mit H₂O auf 1 L auffüllen

Waschpuffer

780 ml TRIS 0,2

24,96 g NaCl

mit H₂O auf 3 L auffüllen

Blockingpuffer

120 ml TRIS 0,2M

2,4g NaCl

60 ml TritonX100

1 ml 1% FCS

1 ml 1% Ziegenserum

Mit H₂O auf 250 ml auffüllen

Phosphatpuffer

29,7 g Na₂HPO₄

4,6 g NaH₂PO₄

mit H₂O auf 1 L auffüllen

Mcllvaine-Puffer

21 g Zitronensäure 0,1M ad 1 l A.d. (Lösung A)

35,6 g Na₂HPO₄ 0,2M ad 1 L A.d. (Lösung B)

67,8 ml Lösung A + 32,2 ml Lösung B, bei pH 3,6

PBS

137mM NaCl

2,7mM KCl

10mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

2mM KH₂PO

2.2.1 Probenentnahme und Fixierung

Zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung wurden Aggregate an Tag 14 sowie an Tag 28 entnommen. Diese wurden zuerst für eine Stunde in 4%igem Paraformaldehyd fixiert, anschließend für 30 Minuten in Phosphatpuffer gewaschen und danach für jeweils eine Stunde in aufsteigender (10, 20, 30%)

Konzentration in in Phosphatpuffer gelöster Saccharose inkubiert. Anschließend wurden die Aggregate in TissueTek (Sakura, Deutschland) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus den so hergestellten Blöcken wurden dann am Microm HM 500 Crytom (Microm, Deutschland) 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

2.2.2 DMMB-Färbung

DMMB (1-9-Dimethylmethylenblau) ist ein kationischer Farbstoff, der spezifisch an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) bindet (Farndale 1986), einem Hauptbestandteil des adulten Gelenkknorpels (Mankin 1974).

Nach Wässerung in entionisiertem Wasser zur Entfernung des TissueTek wurden die zuvor angefertigten Schnitte in 0,1%igem DMMB gefärbt. Der blaue Farbstoff wechselt abhängig von der Glykosaminoglykankonzentration die Farbe nach Purpur. Nach zweimaligem kurzem Waschen der Schnitte in Wasser erfolgte die Dehydrierung durch jeweils fünfminütige Inkubation in 2x 100%igem Propanol und 2x 100%igem Xylol. Dann wurden die Präparate mit DePex-Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland) eingedeckelt und mikroskopisch untersucht.

2.2.3 Alkalische Phosphatase (ALP)-Färbung

Für die ALP-Färbungen wurden die Schnitte zuerst für 5 Minuten in H₂O inkubiert und dann mit Hilfe eines Färbekits (Na-Nitrit-Lösung; FBB-Alkaline-Lösung; Naphtol AS-BI Alkaline-Lösung) für alkalische Phosphatase der Firma Sigma Aldrich für 15 Minuten gemäß Herstelleranleitung gefärbt. Als Gegenfärbung wurde Neutralrot für 2 Minuten verwendet bzw. bis makroskopisch eine Färbung der Aggregate sichtbar wurde. Die Schnitte wurden in Karion (Caelo, Deutschland) luftdicht abgeriegelt und mikroskopisch untersucht.

2.2.4 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Auswertung wurden die Gefrierschnitte zuerst für 10 Minuten in Waschpuffer rehydriert, bevor sie für 30 Minuten in 3% H_2O_2 /10%Methanol in PBS inkubiert wurden, um die endogenen Peptidasen zu blockieren. Nach Spülen der Schnitte in Waschpuffer erfolgte ein kurzes Andauen der Schnitte mit 3 mg/ml Pepsin in 1x McIlvaine-Puffer bei 37° für 15 Minuten. Die Schnitte für die Kollagen X Färbungen wurden vor der Pepsinandauung noch für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2% Hyaluronidase angedaut. Nachfolgend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 60 Minuten in Blockingpuffer inkubiert, bevor über Nacht die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper bei Raumtemperatur (Koll. I und II) bzw. bei 4°C (Koll. X) erfolgte. Am nächsten Tag erfolgte nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 60 Minuten die Entwicklung mit einem HRP-konjugierten Streptavidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, USA) sowie DAB (Sigma Aldrich).

Antigen	Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Kollagen Typ I	Maus anti-Kollagen- Typ II (Calbiochem, Deutschland)	1:100	Ziege-anti-Maus IgG, biotinyliert (Dianova, Deutschland)	1:100
Kollagen Typ II	Maus anti-Kollagen- Typ II (Calbiochem, Deutschland)	1:100	Ziege-anti-Maus IgG, biotinyliert (Dianova, Deutschland)	1:100
Kollagen Typ X	Maus anti-Kollagen Typ X (Quartett Immunodiagnostika, Deutschland)	1:20	Ziege-anti-Maus IgG, biotinyliert (Dianova, Deutschland)	1:100

Tab. 2.3: Für den Nachweis von Kollagen I, II und X verwendete Antikörper

2.2.5 Mikroskopie

Die angefertigten Schnitte wurden mit Hilfe der folgenden Mikroskope untersucht und fotografiert: Nikon Eclipse TE2000U, Olympus BX 61.

2.3 Aktivitätsmessung der alkalischen Phosphatase im Medium

Verwendete Puffer und Lösungen

Substrat-Lösung

4 mg/ml p-N-Phenolphosphat (Sigma Aldrich)

AP-Puffer

1,5M TRIS pH 9.0

+1mM MgCl

+1mM ZnCl

Für die Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Kulturmedium wurden an Tag 28 Mediumüberstände der Kulturplatten gesammelt und für 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes zu 100 µl Substrat in AP-Puffer in einer 96-Well-Flachbodenplatte hinzugefügt und kurz abzentrifugiert. Dann wurde die Absorbanz bei 405 nm spectrophotometrisch (Genius Plate Reader, Tecan, Deutschland) gemessen. Zunutze macht man sich hier die Änderung der Absorbanz durch die Hydrolyse des p-Nitrophenolphosphat zum gelb gefärbten Reaktionsprodukt p-Nitrophenol + anorganischem Phosphat (Pointe Scientific). Bestimmt wurde die zeitliche Änderung von A_{405} (Kinetikintervall 5 Minuten über 2 Stunden).

2.4 Analyse der Genexpression

2.4.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Für die Analyse der Genexpression (untersuchte Gene s. Tab. 2.2) wurden an Tag 1, 3, 7, 14, 21 und 28 jeweils 5 bis 6 Aggregate pro Bedingung entnommen, gepoolt, in

jeweils 1 ml RNA-Bee (RNA Isolation Solvent, Tel-Test Inc, USA) inkubiert und homogenisiert (Power Gen 1000, Fischer Scientific). Anschließend wurde die RNA wie folgt isoliert und gereinigt:

- RNA-Extraktion
 - Zugabe von 100 µl Chloroform pro Homogenat, 15 sek. per Hand stark schütteln
 - 5 Minuten Inkubation bei 4°C
 - Zentrifugation bei 12.000g für 15 Minuten (führt zur Phasentrennung des Homogenats in eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, und eine untere Proteinphase)
- RNA-Präzipitation
 - Überführung der wässrigen Phase in ein neues Eppendorfcup
 - Zugabe von ~400 µl Isopropanol, vorsichtiges mischen mit der Pipette
 - Inkubation für 45 Minuten auf Eis (4°C)
 - Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min
- RNA-Reinigung
 - Vorsichtige Entfernung des Überstandes
 - Zugabe von 800 µl 75%igem Ethanol zum Pellet
 - Mischen mit Vortex
 - Zentrifugation bei 7500 g für 8 Minuten
 - Entfernung des Überstandes
 - Lufttrocknen der Pellets unter der Sterilbank für 60-90 Minuten
 - Lösen der Proben in 20 µl DEPC-Wasser

Im Anschluß wurden die Proben mit dem DNA-free Kit (Ambion by life technologies) behandelt um evtl. noch vorhandene DNA zu entfernen bevor die RNA-Konzentration mit Hilfe eines Picodrop-Messgerätes (Biozym) bestimmt wurde. Dann wurden jeweils 1 µg RNA mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit (Roche) nach folgendem Protokoll in cDNA umgeschrieben:

- 1 µg RNA
- 1 µl Oligo (dT) Primer
- ad 13 µl DEPC-Wasser

- Denaturierung bei 65°C für 10 Minuten
- anzentrifugieren und sofort auf Eis

Anschließend hinzufügen:

- 4 µl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer
- 0,5 µl RNase Inhibitor
- 2 µl dNTP-Mix
- 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase
- Gesamtvolumen 20 µl

Dann wurden die Proben gemischt, kurz anzentrifugiert und bei 50°C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend Inaktivierung bei 85°C für 5 Minuten und Stop der Reaktion auf Eis.

2.4.2 Real-Time PCR

Die Genexpressionsanalyse wurde mit Hilfe des CFX96 Real Time PCR Detection System (Biorad, Deutschland) durchgeführt. Die untersuchten Gene sowie die Primersequenzen sind in Tab. 2.2 aufgelistet.

Gen	Primer-Sequenz	Konzentration
HPRT	<i>for.</i> CGAGATGTGATGAAGGAGATGG	150nM
	<i>rev.</i> GCAGGTCAGCAAAGAATTTATAGC	
Kollagen Typ I	<i>for.:</i> ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC	200nM
	<i>rev.:</i> ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC	
Kollagen Typ II	<i>for.</i> GGGCAATAGCAGGTTACGTA	200nM
	<i>rev.</i> TGTTCGTGCAGCCATCCT	
Kollagen Typ X	<i>for.</i> CCCTCTTGTTAGTGCCAACC	200nM
	<i>rev.</i> AGATTCCAGTCCTTGGGTCA	
RunX2	<i>for.</i> ATACCGAGTGACTTTAGGGATGC	200nM
	<i>rev.</i> AGTGAGGGTGGAGGGAAGAAG	
SOX9	<i>for.</i> ACACACAGCTCACTCGACCTTG	200nM
	<i>rev.</i> AGGGAATTCTGGTTGGTCCTCT	

Tab. 2.4: In der PCR verwendete Primer

Die cDNA wurde auf eine Konzentration von 1ng/ μ l verdünnt, die Reaktionsansätze wurden mit dem Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) mit folgenden Volumina hergestellt:

Primermix (for. and rev.)	1,5 μ l
SYBR Green	7,5 μ l
DEPC-Wasser	1 μ l
<u>cDNA</u>	<u>5μl</u>
Gesamtvolumen	15 μ l

Die Proben wurden als Triplikate auf eine 96-Well-PCR-Platte aufgetragen und anschließend die PCR mit folgendem Temperaturprofil gestartet. Initiale Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung bei 95°C für 10 Sekunden, Annealing und Elongation bei 60°C für 30 Sekunden.

Die Expression der Zielgene wurde nach dem Hauskeepergen HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) normiert.

2.5 Statistik

Die Daten der PCR und der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurden dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Experimente wurden mit Material von 4 Spendern durchgeführt. Für die Analysen der statistischen Signifikanzen wurde ein gepaarter, zweiseitiger Student-T-Test verwendet. Es galt ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Die Versuche zur Bestimmung der Veränderung der Zellgröße, der alkalischen Phosphatase im Kulturmedium, sowie die Genexpressionsanalysen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Alexandra Karl durchgeführt und beinhalten gemeinsame Daten.

3 Ergebnisse

Der positive Einfluß der BMPs in der Zellkultur auf das hypertrophe Wachstums- und Differenzierungsverhalten der mesenchymalen Stammzellen ist durch verschiedene Vorversuche aus unserem Labor bekannt. In den hier durchgeführten Versuchen wurde das beschriebene, Hypertrophie induzierende Chondrogenesemodell verwendet und die Aggregate mit Noggingkonzentrationen von 0 ng/ml (Kontrolle) ,10 ng/ml, 30 ng/ml, 100 ng/ml und 500 ng/ml behandelt, um dessen Auswirkungen auf die Zellen in vitro zu untersuchen. Es wurden dann Färbungen mit DMMB, Alkalischer Phosphatase, sowie Immunfärbungen mit Kollagen Typ I, Typ II und Typ X durchgeführt. Weiterhin wurden die Veränderung der Zellgröße und die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Kulturmedium, sowie die Expression einzelner Gene mittels PCR bestimmt.

3.1 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden Aggregate an Tag 14 und Tag 28 entnommen und gefärbt. Zuerst wurde dabei die Induktion der Hypertrophie im verwendeten Chondrogenesemodell im jeweiligen Standardmedium ohne den Zusatz von Noggin überprüft. Nach der 14-tägigen Vordifferenzierungsphase im chondrogenen Medium (Abb. 3.1 A, noch kaum differenziertes Aggregat) findet sich an Tag 28 dann zum einen ein gut differenzierter chondrogener Phänotyp in den im chondrogenen Medium verbliebenen Aggregaten (Abb. 3.1 B), in den hypertrophen Kontrollgruppen zeigt sich nach dem Wechsel zum hypertrophen Medium zum anderen eine deutlich ausgeprägte Hypertrophie mit typischen großen Lakunen im gesamten Aggregat (Abb.3.1C+D).

Anschließend erfolgte die Analyse der mit den oben genannten Noggingkonzentrationen behandelten Aggregate. Die histologischen Befunde der chondrogenen Aggregate zeigen in der DMMB-Färbung eine noch wenig ausgeprägte Differenzierung an Tag 14 (Abb.3.2 A), in den Schnitten von Tag 28 dann jedoch eine normale chondrogene Differenzierung sowohl der

Kontrollaggregate als auch der mit Noggin behandelten Aggregate und auch hohe Dosen von Noggin führen nicht zur Veränderung des chondrogenen Phänotyps (Abb.3.2 B-F).

In der alkalischen Phosphatase-Färbung werden in allen Bedingungen vereinzelt ALP-positive Zellen im gesamten Aggregat, vor allem jedoch an dessen Rändern gefunden. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen bzw. ein signifikanter Einfluß auf das Vorhandensein dieser Zellen zeigt sich auch nach Behandlung mit Noggin nicht (Abb.3.3).

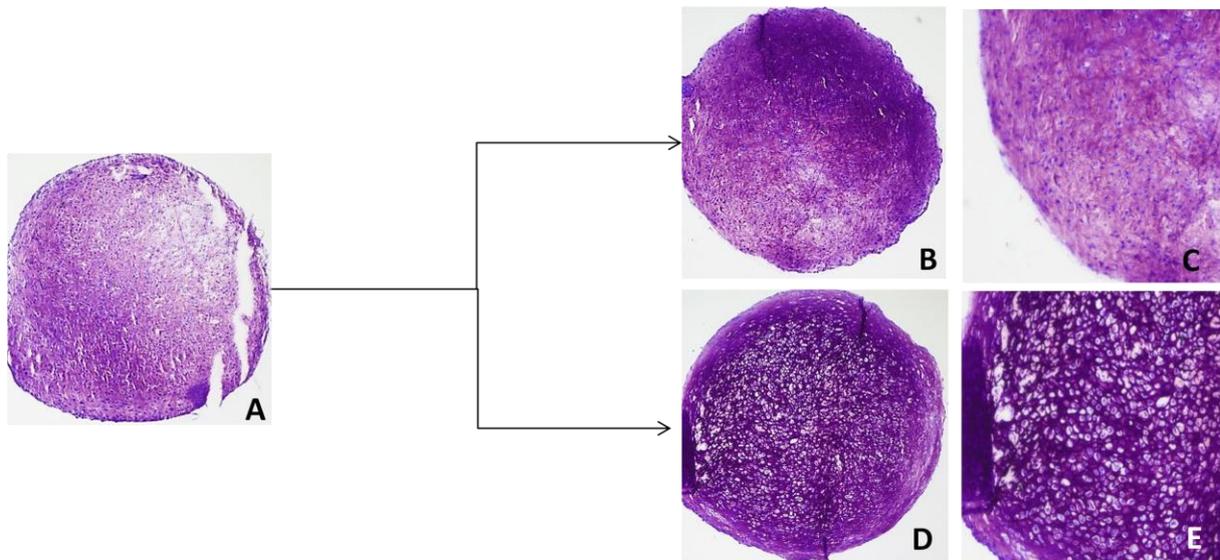


Abb. 3.1: Induktion der Hypertrophie im verwendeten Chondrogenesmodell ohne Zusatz von Noggin. Nach 14 Tagen Vordifferenzierung im chondrogenen Medium zeigen sich die Aggregate noch wenig differenziert (**A**), an Tag 28 findet sich dann ein gut differenzierter chondrogener (**B** und **C**, Vergrößerung des selben Aggregates, Maßstab=200µm) bzw. nach Änderung des Mediums in der hypertrophen Kontrollgruppe ein deutlich ausgeprägter hypertropher Phänotyp (**D**), in der Vergrößerung zeigen sich die typischen Lakunen im gesamten Aggregat (**E**, Maßstab=200µm).

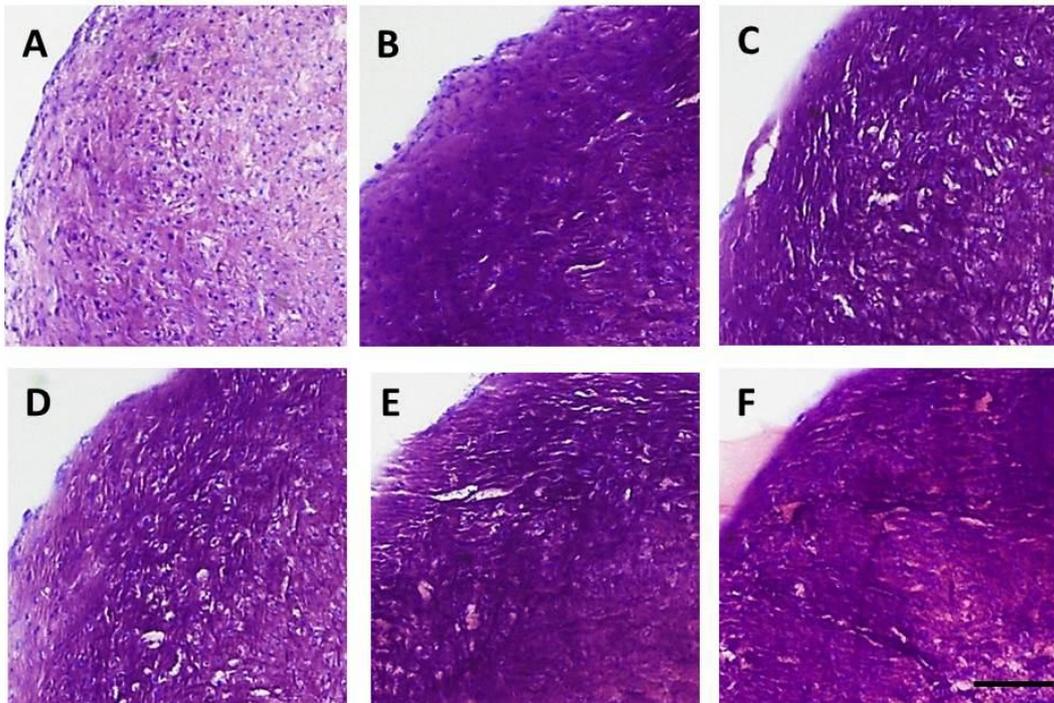


Abb. 3.2: DMMB-Färbung der chondrogenen Aggregate. An Tag 14 findet sich eine noch wenig ausgeprägte chondrogene Differenzierung (A). Die Aggregate an Tag 28 (B-F) zeigen sich gut differenziert und auch die Behandlung mit Noggin führt nicht zur Veränderung des chondrogenen Phänotyps (B=Kontrolle, C=10ng/ml Noggin, D=30ng/ml, E=100ng/ml, F=500ng/ml) Maßstab =200µm

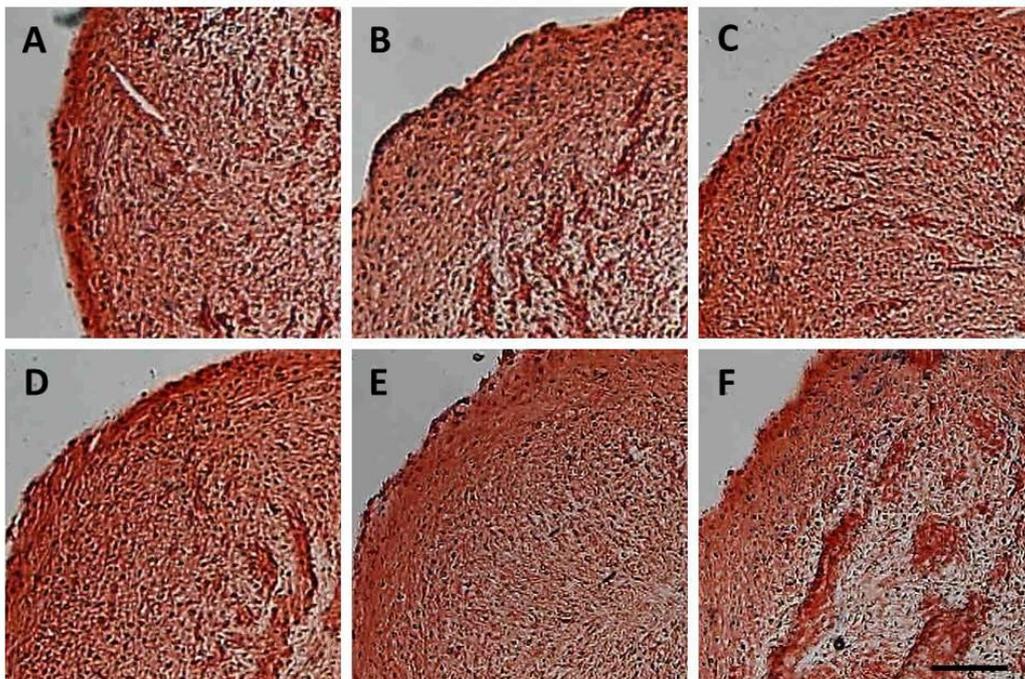


Abb. 3.3: ALP-Färbung der chondrogenen Aggregate. Einzelne ALP-positive Zellen (blau) im gesamten Aggregat, vornehmlich am Rand, es zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Bedingungen. Noggin beeinflusst das Vorkommen dieser Zellen nicht (A=Pellet an Tag 14, B=Kontrolle, C=10ng/ml, D=30ng/ml, E=100ng/ml, F=500ng/ml). Als Gegenfärbung wurde Neutralrot verwendet. Maßstab =200µm.

In den immunhistochemischen Färbungen mit Kollagen Typ I finden sich keine Unterschiede zwischen den Bedingungen an Tag 14 (Abb.3.4 A) und der Kontrollgruppe an Tag 28 (Abb.3.4 B) sowie den mit Noggin behandelten Aggregaten (Abb.3.4 C-F). Es zeigt sich eine gleichmäßige Färbung aller Aggregate.

Kollagen Typ II zeigt eine schwache Färbung an Tag 14 mit großen Lücken im gesamten Aggregat (Abb.3.5 A). Die Aggregate an Tag 28 sind gleichmäßig gefärbt, es finden sich keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (Abb.3.5 B) und den mit Noggin behandelten Aggregaten (Abb.3.5 C-F).

An Tag 14 zeigen sich die Aggregate noch vollständig negativ für Kollagen Typ X (Abb.3.6 A), während an Tag 28 in allen Aggregaten eine diskrete Färbung nachgewiesen werden kann, am deutlichsten zeigt sich dies in der Kontrolle (Abb.3.6 B). Im Vergleich hierzu präsentieren sich die Aggregate unter Noggineinfluß (Abb.3.6 C-F) schwächer gefärbt, wobei hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen festgestellt werden konnten.

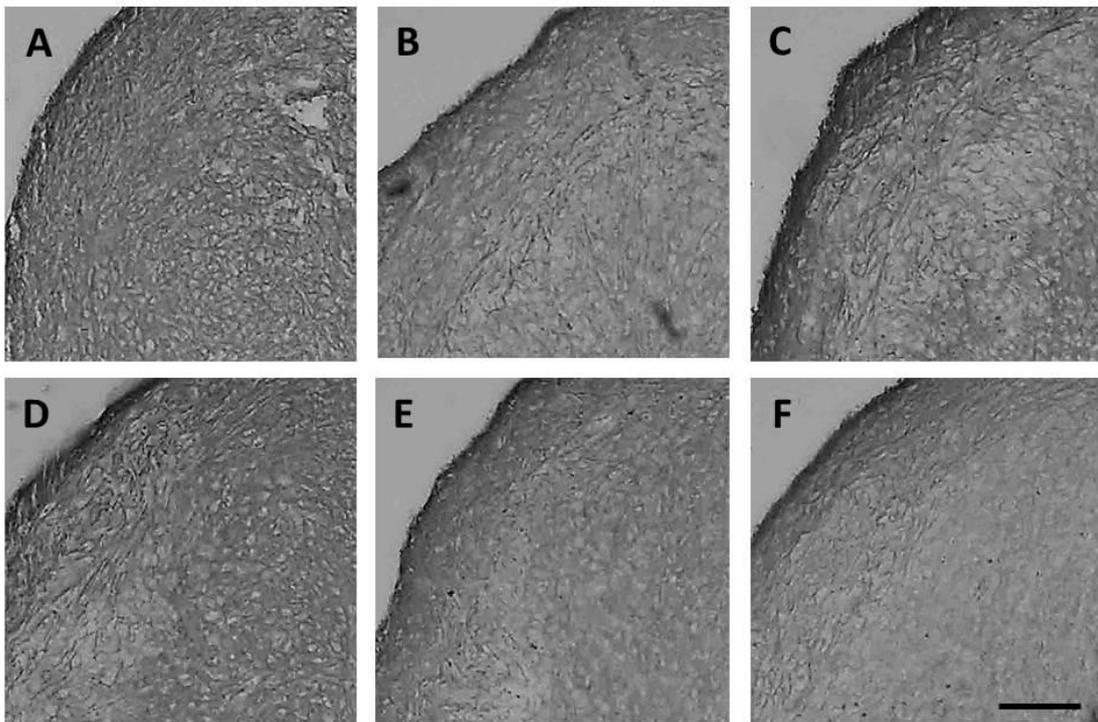


Abb. 3.4: Immunhistochemie Kollagen Typ I der chondrogenen Aggregate an Tag 14 (A) und Tag 28 (B-F). Gleichmäßige Färbung der Aggregate an allen Tagen, auch die Behandlung mit Noggin führt zu keinem Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen. (B=Kontrolle, C=10ng/ml, D=30ng/ml, E=100ng/ml, F=500ng/ml). Maßstab =200µm.

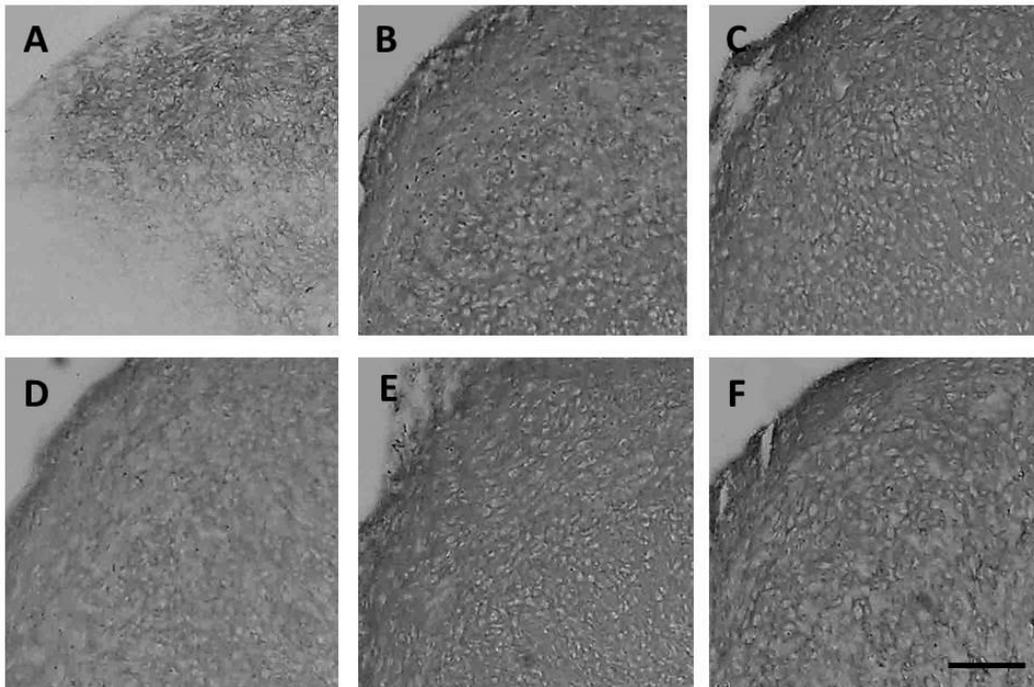


Abb. 3.5: Immunhistochemie Kollagen Typ II der chondrogenen Aggregate. An Tag 14 zeigen sich schwach gefärbte Aggregate, die nicht in allen Abschnitten Kollagen II aufweisen (A), an Tag 28 (B-F) finden sich gleichmäßig gefärbte Aggregate ohne Unterschiede zwischen den Bedingungen (B=Kontrolle, C=10ng/ml, D=30ng/ml, E=100ng/ml, F=500ng/ml) Maßstab =200 μ m.

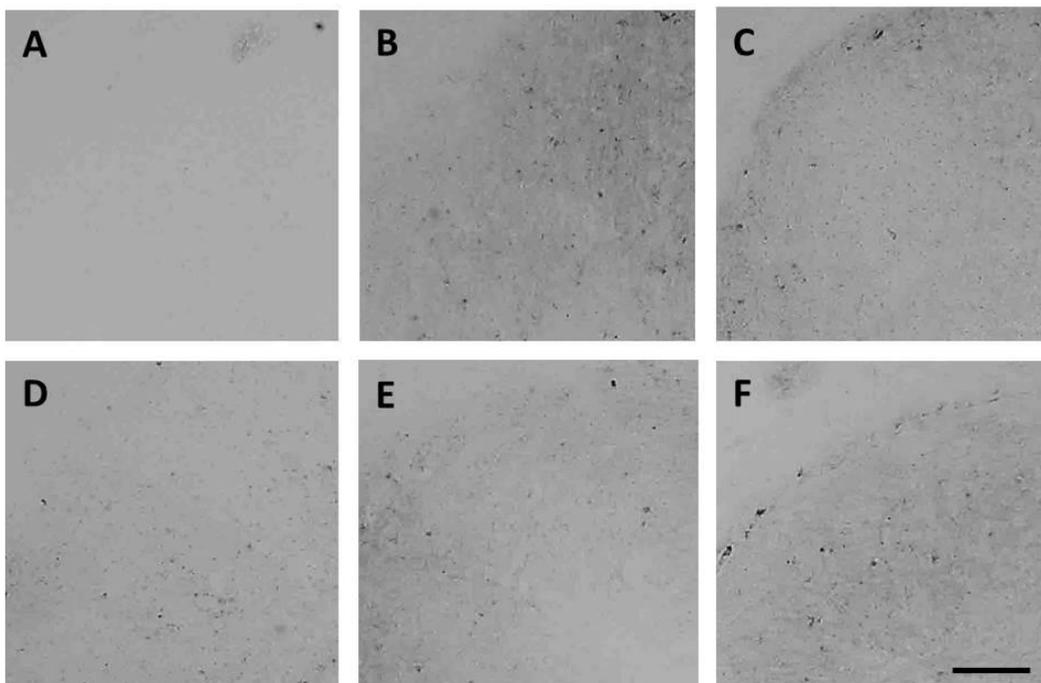


Abb. 3.6: Immunhistochemie Kollagen Typ X der chondrogenen Aggregate. An Tag 14 sind präsentieren sich die Aggregate noch vollständig negativ für Kollagen Typ X (A), während sich an Tag 28 (B-F) eine schwache Färbung in allen Aggregaten findet, geringfügig deutlicher in der Kontrolle (B), insgesamt jedoch ohne wesentliche Unterschiede zwischen den Bedingungen (C=10ng/ml, D=30ng/ml, E=100ng/ml, F=500ng/ml). Maßstab =200 μ m.

Unter hypertrophen Bedingungen weisen die Aggregate bereits makroskopisch eine je nach Nogginkonzentration dosisabhängige Verminderung der Pelletgröße auf (Abb.3.7), auch kann hier bereits bei geringer Vergrößerung eine deutliche Dedifferenzierung festgestellt werden.



Abb.3.7: Gesamtansicht der hypertrophen Pellets an Tag 28. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (A) verlieren die Pellets unter Noggin einfluß (B-E) mit steigender Nogginkonzentration zunehmend an Größe (B=10ng/ml; C=30ng/ml; D=100ng/ml; E=500ng/ml)

In der DMMB-Färbung zeigen die Kontrollaggregate eine ausgeprägte Entwicklung des hypertrophen Phänotyps mit deutlicher Zunahme des Zellvolumens (Abb.3.8 A). Bereits die Einwirkung von 10 ng/ml Noggin bewirkt eine Verminderung der Zellgröße (Abb.3.8 B), bei 30 ng/ml (Abb.3.8 C) sind nur noch vereinzelte, und bereits während die Behandlung mit 100 ng/ml (Abb.3.8 D) keine hypertrophen Zellen mehr zu erkennen. Außerdem zeigt sich ab 30 ng/ml eine insgesamt schwächere Färbung der Aggregate.

Die ALP-Färbung zeigt ein gleichmäßig über das ganze Aggregat verteiltes Auftreten ALP-positiver Zellen in der Kontrollgruppe (Abb.3.9 A). Mit steigender Nogginkonzentration nimmt deren Anzahl im Zentrum der Aggregate deutlich ab, bis bei hohen Konzentrationen von Noggin nur noch vereinzelte Zellen bzw. Zellnester am Rande der Aggregate zu erkennen sind (Abb.3.9 B-E).

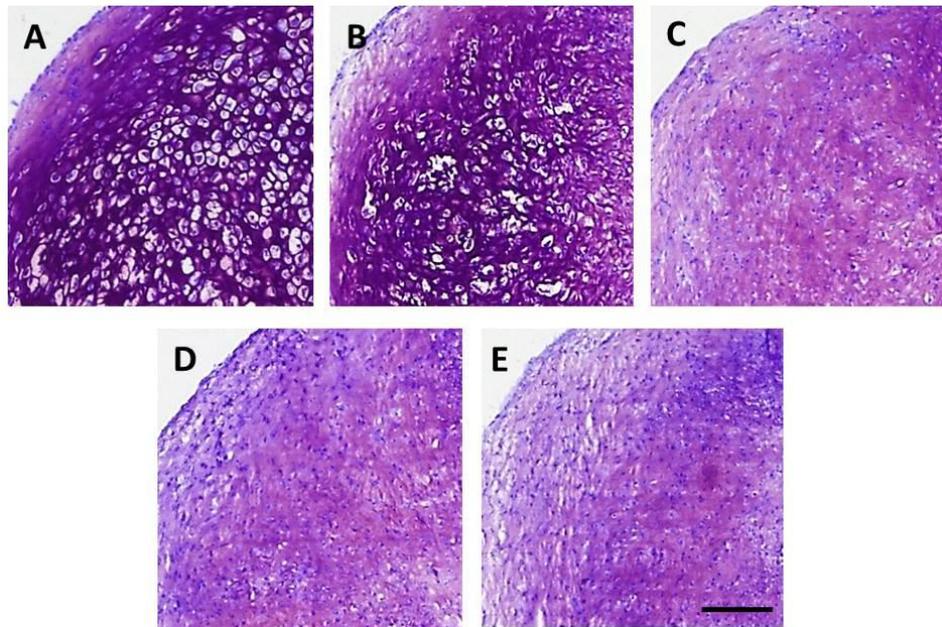


Abb. 3.8: DMMB-Färbung der hypertrophen Aggregate an Tag 28. Die Kontrollgruppe (A) zeigt gut hypertroph differenzierte Zellen. Bereits 10 ng/ml Noggin (B) bewirken eine Reduktion der Hypertrophie, ab einer Konzentration von 30 ng/ml (C) sind die Aggregate insgesamt schwächer gefärbt und es sind nur noch vereinzelt hypertrophe Zellen zu finden, Konzentrationen von 100 ng/ml und 500 ng/ml führen zur Inhibition von Hypertrophie (D,E). Maßstab =200µm.

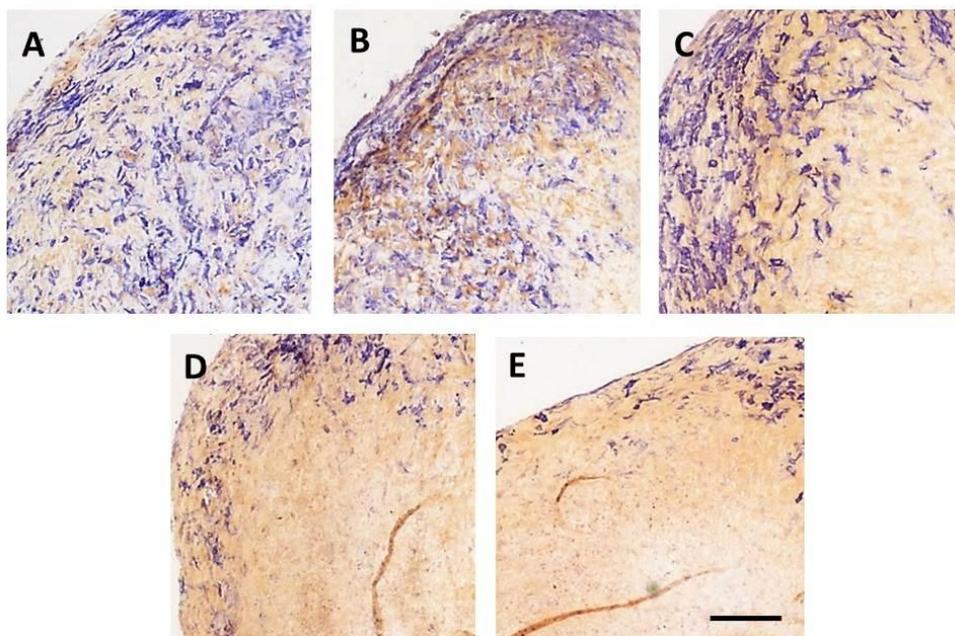


Abb. 3.9: ALP-Färbung der hypertrophen Aggregate an Tag 28. Die Kontrollgruppe (A) zeigt über das ganze Aggregat gleichmäßig verteilt eine große Anzahl ALP-positiver Zellen (blau). Die Exposition mit 10 ng/ml (B) und 30 ng/ml Noggin (C) verringert diese Zahl bereits sichtbar. Bei einer Konzentration von 100 ng/ml (D) ist nur noch ein Randsaum mit ALP-positiven Zellen zu erkennen, während das Pelletinnere keine solchen Zellen mehr aufweist. Bei 500 ng/ml (E) sind nur noch einzelne Zellen bzw. kleinere Zellnester am Rand auszumachen. Als Gegenfärbung wurde Neutralrot verwendet. Maßstab =200µm.

Die Immunhistochemie mit Kollagen Typ I an Tag 28 zeigt eine deutliche und gleichmäßige Färbung des gesamten Aggregates, es finden sich keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (Abb.3.10 A) und den mit Noggin behandelten Pellets (Abb.3.10 B-E).

Die Färbungen von Kollagen Typ II zeigen dagegen große Unterschiede. Die Kontrollgruppe (Abb.3.11 A) weist eine homogene Färbung des gesamten Aggregates auf. Bei Behandlung mit 10 ng/ml Noggin zeigt sich bereits eine abgeschwächte Färbung des Aggregatrandes (Abb.3.11 B). Aggregate, die mit höheren Dosen Noggin behandelt wurden, zeigen dosisabhängig größere, nicht gefärbte Bereiche im gesamten Aggregat (Abb.3.11 C-F) als Ausdruck einer Dedifferenzierung der Zellen.

Die mit Kollagen X gefärbten Aggregate weisen ebenfalls deutliche Unterschiede auf. Die Kontrolle zeigt noch eine starke, gleichmäßige und lückenlose Färbung (Abb.3.12 A), bereits bei 10 ng/ml Noggin findet sich jedoch schon eine zwar noch gut sichtbare, aber nicht mehr gleichmäßige Anfärbung (Abb.3.12 B). Die Aggregate mit höheren Konzentrationen Noggin zeigen nur mehr eine sehr schwache Anfärbung, und sind insgesamt von großen Lücken durchzogen (Abb.3.11 C-F).

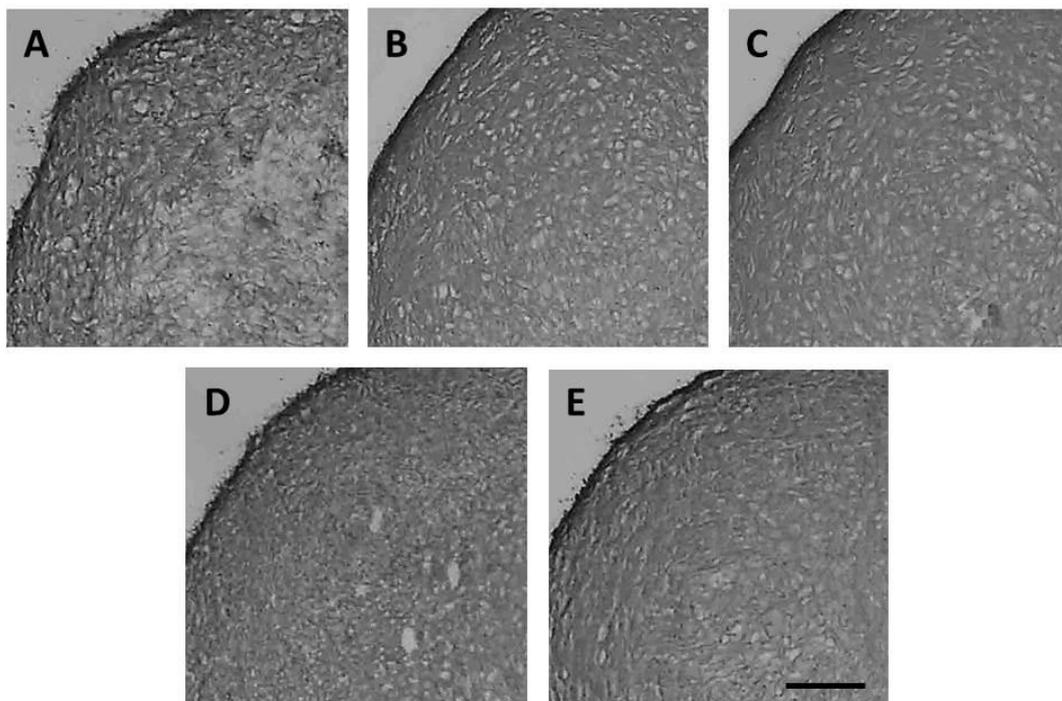


Abb. 3.10: Immunhistochemie Kollagen Typ I der hypertrophen Aggregate an Tag 28. Die Aggregate präsentieren sich stark gefärbt, es sind keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (A) und den mit Noggin behandelten Aggregaten (B-E) auszumachen (B=10ng/ml; C=30ng/ml; D=100ng/ml; E=500ng/ml). Maßstab =200µm.

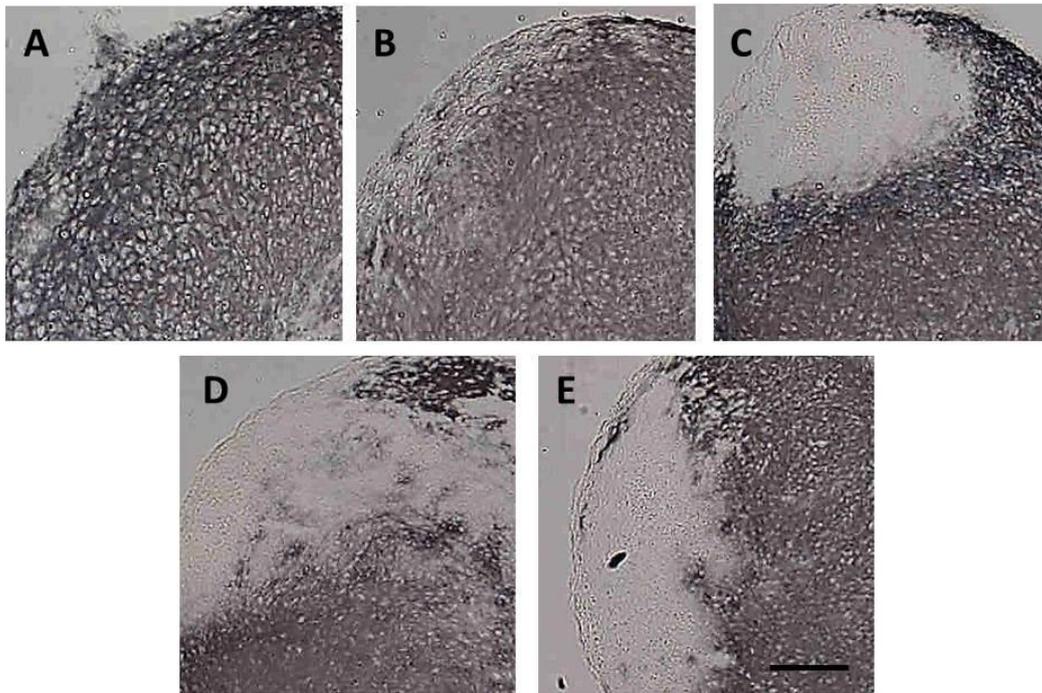


Abb. 3.11: Immunhistochemie Kollagen Typ II der hypertrophen Aggregate an Tag 28. Die Kontrollgruppe (A) präsentiert sich homogen gefärbt. Bereits die Behandlung mit 10ng/ml Noggin führt zu einer verringerten Färbung besonders des Aggregatrandes (B). Höhere Dosen Noggin führen zu großen, nicht gefärbten Lücken im gesamten Aggregat als Ausdruck einer Dedifferenzierung (C=30ng/ml, D=100ng/ml, E=500ng/ml). Maßstab =200µm.

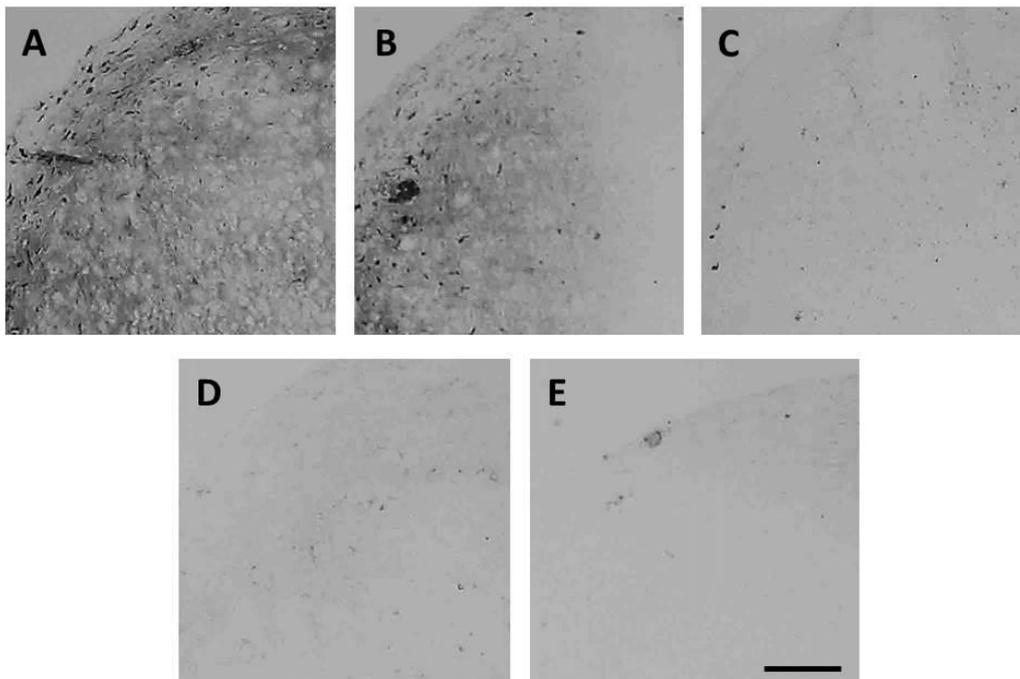


Abb. 3.12: Immunhistochemie Kollagen Typ X der hypertrophen Aggregate an Tag 28. Starke Färbung in der Kontrolle im gesamten Aggregat (A). Ebenso bei 10ng/ml Noggin (B), wobei hier schon Lücken im Aggregat auszumachen sind. Bei 30ng/ml (C) und 100ng/ml (D) ist nur noch eine schwache, ungleichmäßige Färbung zu sehen, bei 500ng/ml (E) sind kaum mehr Kollagen X-positive Zellen im Aggregat zu finden. Maßstab =200µm.

Da in den chondrogenen Aggregaten auch bei einer Nogginkonzentration von 500 ng/ml keine Änderung des Phänotyps und in den hypertrophen Aggregaten bereits bei 100 ng/ml eine deutlich Inhibition der Hypertrophie bzw. bei 500 ng/ml keine weitere Steigerung der Inhibition gefunden wurde, wurden die folgenden Versuche neben der Kontrolle nur mit den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml durchgeführt.

3.2 Histomorphometrie

Die histologischen Beobachtungen der hypertrophen Aggregate lassen vermuten, daß auch die Größe der einzelnen Zellen der mit Noggin behandelten Aggregate bei steigender Nogginkonzentration abnimmt. Daher wurden die entnommenen Aggregate an Tag 28 histomorphometrisch untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Größe der einzelnen Zellen der hypertrophen Aggregate unter Nogginbehandlung signifikant abnimmt, während die Größe der chondrogenen Zellen nicht beeinflusst ist (Abb.3.13).

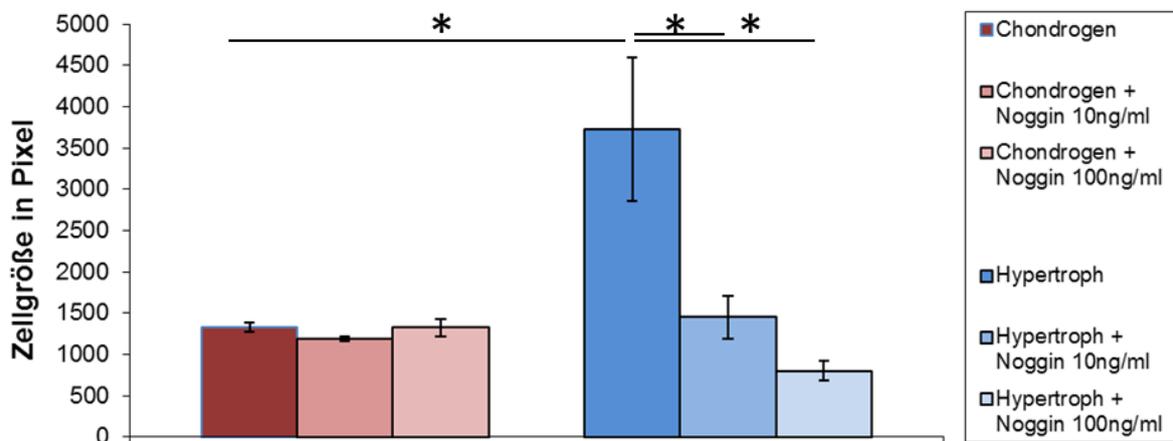


Abb.3.13: Histomorphometrie an Tag 28. Die ausgemessenen hypertrophen Zellen (blau) zeigen bei steigender Nogginkonzentration eine deutliche Größenabnahme, während Noggin auf die chondrogenen Zellen (rot) keinen Effekt hat. n=4 different donors. * = p < 0,05. Error bars: Standardabweichung.

3.3 ALP-Aktivität im Mediumüberstand

Außerdem wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Kulturmedium an Tag 28 überprüft. Diese Untersuchung zeigt, daß im Vergleich zur unbehandelten chondrogenen Kontrollgruppe diese bei den unbehandelten hypertrophen Aggregaten signifikant ansteigt. Die mit Noggin behandelten hypertrophen Aggregate zeigen eine dosisabhängige und signifikante Verminderung der Aktivität, während Noggin keinen Einfluß auf die chondrogenen Bedingungen hat (Abb.3.14).

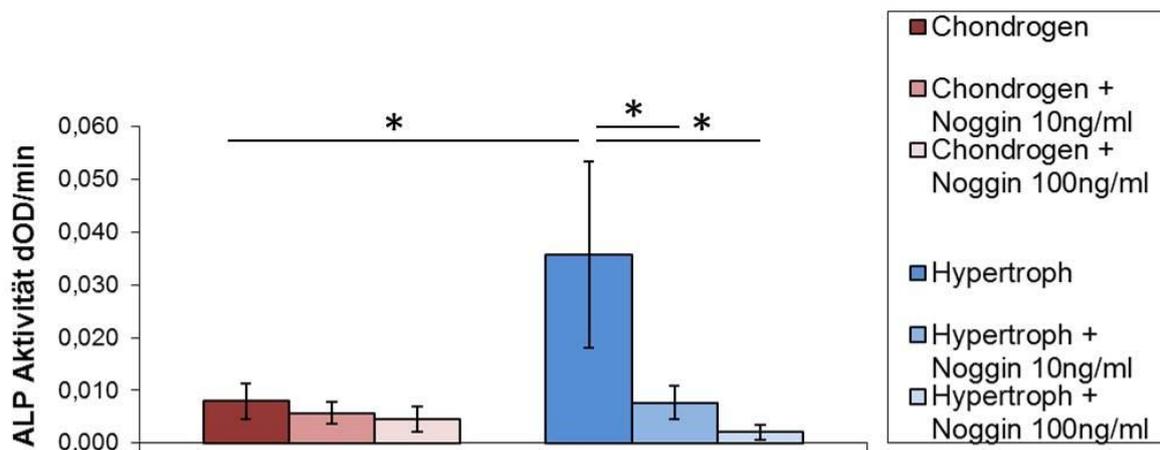


Abb. 3.14: Aktivität der alkalischen Phosphatase an Tag 28. Noggin hat keinen Einfluß auf die Aktivität in den chondrogenen Bedingungen (rot). Im Vergleich mit der chondrogenen Kontrollgruppe zeigt sich ein signifikanter Anstieg der ALP-Aktivität in der hypertrophen Kontrollgruppe. Unter Nogginbehandlung kommt es dosisabhängig zu einer starken Unterdrückung der ALP in den weiteren hypertrophen Gruppen (blau). n=4 different donors. * = $p < 0,05$. Error bars: Standardabweichung.

3.4 Genexpressionsanalysen

Weiterhin wurde der Einfluß von Noggin auf die Genexpression untersucht, im Einzelnen wurde die Expression von Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Kollagen Typ X bestimmt. Dabei wurden die histologischen Ergebnisse bestätigt. Die Expression von Kollagen Typ I zeigt an beiden Tagen weder unter chondrogenen, noch unter hypertrophen Bedingungen eine signifikante Änderung in den mit Noggin behandelten Aggregaten (Abb.3.15). Kollagen Typ II weist keine Änderungen in den chondrogenen Aggregaten an Tag 21 und 28 auf. In den hypertrophen Aggregaten beider Tage ist die Genexpression dosisabhängig signifikant herabgesetzt

(Abb.3.16). Auch bei Kollagen Typ X zeigen sich keine Änderungen in den chondrogenen Bedingungen beider Tage, die Expression in den hypertropen und mit Noggin behandelten Aggregaten ist im Vergleich mit den Kontrollgruppen ebenfalls dosisabhängig und signifikant erniedrigt (Abb.3.17).

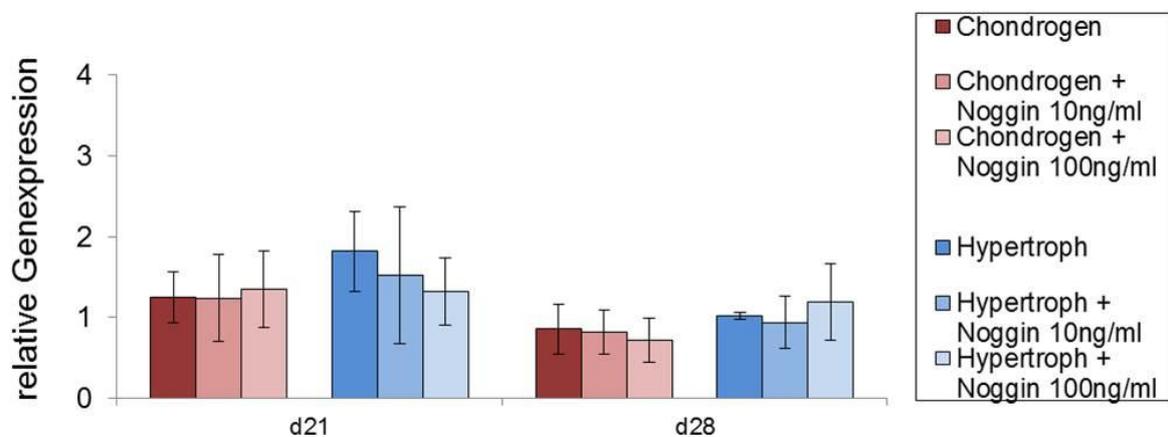


Abb. 3.15: Genexpressionsanalyse Kollagen Typ I an Tag 21 und 28. Kein signifikanter Einfluß von Noggin auf chondrogene und hypertrophe Bedingungen an beiden Tagen. n=4 different donors. * = $p < 0,05$. Error bars: Standardabweichung.

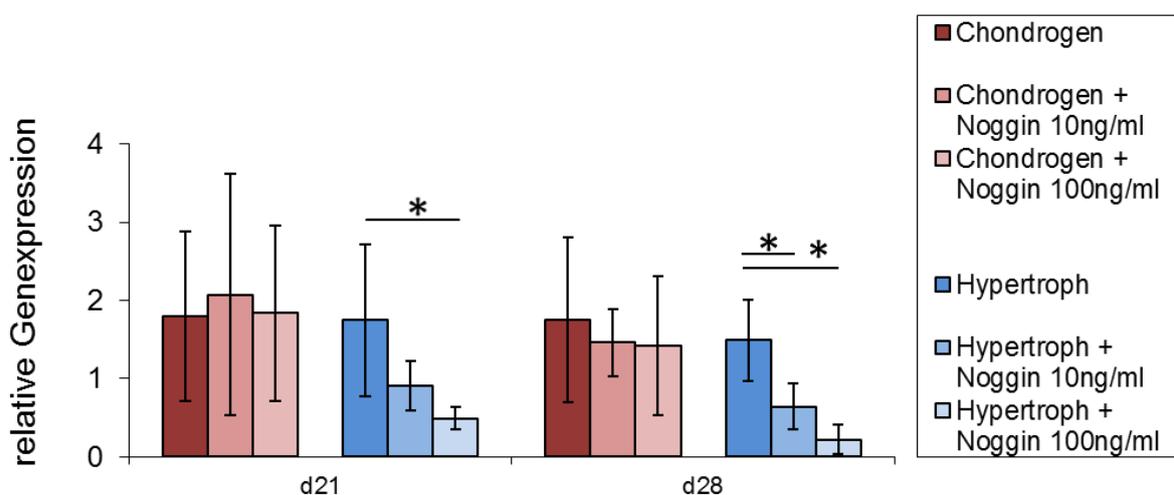


Abb. 3.16: Genexpressionsanalyse Kollagen Typ II an Tag 21 und 28. Es zeigen sich keine Änderungen in den chondrogenen Bedingungen, während in den hypertropen Aggregaten an beiden Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe die Genexpression dosisabhängig und signifikant vermindert ist. n=4 different donors. * = $p < 0,05$. Error bars: Standardabweichung.

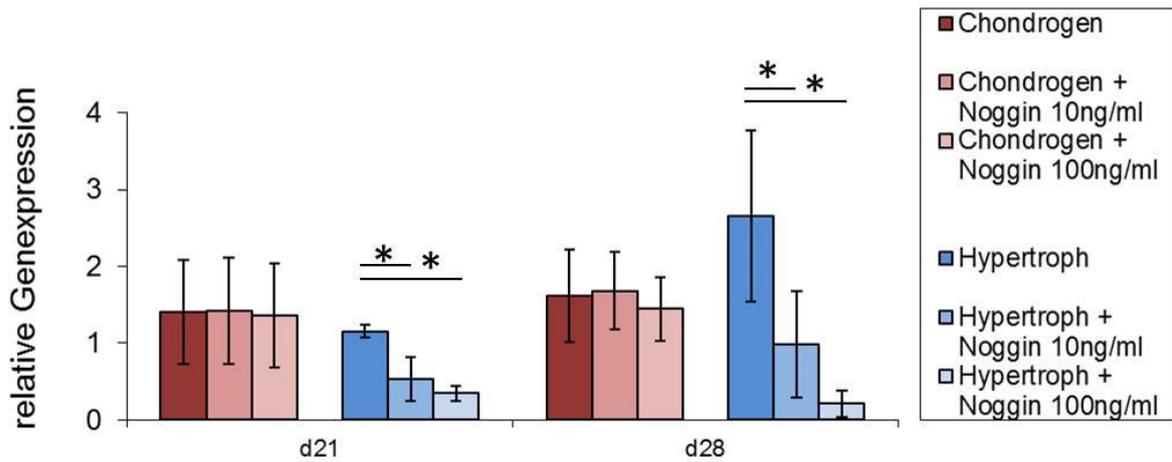


Abb. 3.17: Genexpressionsanalyse Kollagen Typ X an Tag 21 und 28. Keine Änderungen in den chondrogenen Aggregaten an Tag 21 und 28. Die Genexpression ist in den hypertrophen Bedingungen an beiden Tagen in den mit Noggin behandelten Aggregaten im Vergleich zur Kontrollgruppe dosisabhängig und signifikant erniedrigt. $n=4$ different donors. * = $p < 0,05$. Error bars: Standardabweichung.

4 Diskussion

Hyaliner Knorpel ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung. Bereits 1743 stellten die schottischen Mediziner John und William Hunter fest, daß sich einmal zerstörter Gelenkknorpel nicht mehr vollständig regenerieren kann (Hunter W, 1743). Diese Aussage besteht bis heute, eine restitutio ad integrum, also eine vollständige Ausheilung knorpeliger Defekte mit gleichwertigem hyalinen Knorpel, konnte in Säugetieren bisher nicht beobachtet werden (Breinan et al., 2001). Und die aktuell zur Verfügung stehenden klinischen Verfahren bieten noch nicht die Möglichkeit, ein dauerhaftes, dem natürlichen hyalinen Knorpel funktionell gleichwertiges Ersatzgewebe herzustellen und so die Entstehung von Osteoarthrose aus lokalen Gelenkschäden langfristig zu verhindern. Aufgrund der Fähigkeit humaner mesenchymaler Stammzellen, chondrogen zu differenzieren, bieten diese eventuell die Grundlage, körpereigene Ersatzprodukte herzustellen, die die Qualitäten des nativen hyalinen Knorpels besitzen. Voraussetzung dafür ist jedoch die Entwicklung von Protokollen, die den chondrogenen Phänotyp zuverlässig stabilisieren.

4.1 Einsatz mesenchymaler Stammzellen in vitro

Grundlage der Verwendung von MSCs für in vitro-Analysen ist bereits die Auswahl der Spender sowie im weiteren Verlauf die optimale Isolierung sowie Selektion und Expansion der Zellen. Wie bereits eingangs erwähnt, sind Zellen jüngerer Spender geeigneter, da sowohl die Proliferations- als auch die Selbsterneuerungsfähigkeit der Stammzellen mit zunehmendem Lebensalter abnehmen. Daher wurden auch in dieser Arbeit MSCs von Spendern zwischen 20 und 45 Jahren verwendet, bei denen ein gutes Differenzierungspotential zu erwarten ist (Heng et al., 2004). Lange et al. konnten feststellen, daß zum einen die Anzahl der gewonnenen Zellen entscheidend von der Art der Isolierung abhängt, hier hat sich nach der Gewinnung der Zellen aus dem Knochenmark die Zellauftrennung mittels Ficoll-Gradienten und anschließender Zellselektion durch Adhärenz an den Boden der Zellkulturflaschen bewährt (Pittenger

et al., 1999; Lange et al., 2005). Andererseits stellen die so gewonnenen MSCs auch bei optimaler Isolierung keine homogene Zellpopulation dar, sondern sind vielmehr eine Mischung aus mehreren, morphologisch verschiedenen Zelltypen mit entsprechend jeweils unterschiedlichem Proliferations- und Differenzierungspotential. Es ließe sich hier zwar mithilfe zahlreicher Zellpassagen eine weitgehende Homogenität erreicht werden, dadurch vermindert sich dann allerdings auch das Differenzierungspotential dieser Zellen (Colter et al., 2001). Trotz allem jedoch eignen sich die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes für die Untersuchung bestimmter Einflussfaktoren auf die in vitro-Chondrogenese (Angele et al., 2003).

4.2 Einflussfaktoren der in vitro-Chondrogenese von MSCs

Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Effektes des BMP-Antagonisten Noggin auf die in vitro-Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen, insbesondere dessen Einfluß auf die hypertrophe Differenzierung dieser Zellen. Zur Beantwortung der Fragestellung wurde für die hierzu durchgeführten Versuche ein modifiziertes Aggregatmodell nach Johnstone verwendet, welches sich als einfach zu handhabendes Kulturverfahren auszeichnete und in dem im Prinzip der Prozess der mesenchymalen Zellkondensierung während der endochondralen Ossifikation in der Embryogenese simuliert werden kann, es ermöglicht die Induktion der chondrogenen Differenzierung von MSCs bis hin zur Hypertrophie (Johnstone et al., 1998; Müller et al., 2008; Müller et al., 2010). Dabei hängt wie in vivo der Erfolg der Chondrogenese auch in vitro von der Einwirkung bestimmter Wachstumsfaktoren ab, bei der in vitro-Chondrogenese von MSCs hat sich die auch hier verwendete Medienzusammensetzung mit Dexamethason und verschiedenen Isoformen von TGF- β bewährt (Sekiya et al., 2002; Goldring et al., 2006). Im Rahmen der Chondrogenese sind für TGF- β unterschiedliche Funktionen beschrieben, so induziert es zum einen in den frühen Zellstadien die chondrogene Differenzierung, im weiteren Verlauf hemmt es jedoch die weitere Zellentwicklung und die Hypertrophie der mesenchymalen Stammzellen und hält diese in ihrem chondrogenen Status. Diese scheinbar gegensätzlichen Befunde erklären sich allerdings mit der Abhängigkeit der Wirkung des Wachstumsfaktors vom

Differenzierungsgrad der Zielzelle (vgl. Kap. 1.3.3.1; Stalinska et al., 2005), die antihypertrophen Effekte von TGF- β sind aus verschiedenen Untersuchungen mit u.a. Wachstumsfugenchondrozyten bekannt (Ballock et al., 1993; Ferguson et al., 2000).

Auf der anderen Seite ist die Schlüsselrolle der BMPs für die hypertrophe Differenzierung der MSCs aus vielen Studien bekannt (Yoon et al., 2004). Sowohl BMP-2 als auch BMP-4 und BMP-7 konnten in Chondrozyten von Hühnerembryos die Hypertrophie induzieren, wobei sich BMP-4 in diesem Rahmen als das effektivste herausstellte (Volk et al., 1998). In menschlichen MSCs führte der Gentransfer von BMP-2 und BMP-4 ebenfalls zu einer hypertrophen Differenzierung der Zellen (Steinert et al., 2004). In vivo-Studien mit transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die Überexpression von BMP-4 zu einer gesteigerten Differenzierungsrate mit einer dementsprechend deutlich verdickten hypertrophen Zone führt (Tsumaki et al., 2002). Bestandteil des hypertrophen Mediums in dem verwendeten in vitro-Modell ist das Schilddrüsenhormon T3, das bekanntermaßen ebenfalls in der Lage ist, eine hypertrophe Differenzierung in mesenchymalen Stammzellen sowie in Wachstumsfugenchondrozyten zu induzieren (Mackay et al., 1998; Ballock et al., 2003; Müller et al., 2008). Karl konnte kürzlich einen Zusammenhang zwischen beiden Faktoren zeigen und durch den Vergleich verschiedener Medienzusammensetzungen mit T3 und BMP-4 feststellen, dass die T3-bedingte Hypertrophie der MSCs in diesem in vitro-Modell durch BMP-4 vermittelt wird und BMP-4 insgesamt einen stärkeren prohypertrophen Effekt hat bzw. ein effektiverer Induktor der Hypertrophie ist als T3. Dabei fiel auf, dass dieser Effekt von BMP-4 lediglich im hypertrophen und nicht auch im chondrogenen Medium auftritt, was den erwähnten antihypertrophen Eigenschaften von TGF- β zugeschrieben wird, die hier der augenscheinlich bestimmendere Einflussfaktor sind (Karl 2013; Karl et al., 2014).

4.3 Induktion der Hypertrophie und deren Inhibition durch Noggin

Um nun die Auswirkungen von Noggin auf die chondrogene Differenzierung der MSCs und insbesondere dessen Einfluß auf diese T3-induzierte Hypertrophie zu bestimmen, wurde zuerst geprüft, inwieweit die Änderung der Zusammensetzung des Kulturmediums von chondrogen zu hypertroph auch tatsächlich zu einer Hypertrophie

der Aggregate führt. Durch den Entzug von TGF- β und Dexamethason sowie die Zugabe von T3 wiesen die Aggregate in der hypertrophen Kontrollgruppe ohne Noggin in der Tat eine deutliche Hypertrophie auf, was sich in einem hypertrophen Phänotyp mit entsprechend erhöhter Zellgröße sowie einer hohen Aktivität der alkalischen Phosphatase und einem ausgeprägten Nachweis von Kollagen Typ X in der Immunfärbung äußerte.

Nachfolgend wurden verschiedene Konzentrationen von Noggin sowohl dem chondrogenen als auch dem hypertrophen Kulturmedium beigefügt. Der BMP-Antagonist Noggin verhindert durch eine Komplexbildung mit hoher Bindungsaffinität vor allem für BMP-2 und BMP-4 die Interaktion der BMPs mit dem Rezeptor und somit die Signalübertragung (Zimmermann et al., 1996). In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, daß Noggin in der Lage ist, die T3-induzierte Hypertrophie dosisabhängig zu inhibieren. Dies zeigte sich in den mit Noggin behandelten hypertrophen Aggregaten sowohl histologisch in einer verringerten Anzahl hypertropher Zellen und einer geringeren Zellgröße sowie in einer Größenreduktion des gesamten Aggregates insgesamt, als auch in der deutlichen Reduktion hypertrophiespezifischer Marker. Sowohl die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Medium, als auch die Genexpression von Kollagen Typ X wurde durch die Einwirkung von Noggin signifikant herabgesetzt, weiterhin zeigen die histologischen Bilder der Kollagen Typ X-Immunhistochemie eine deutlich reduzierte Färbung der entsprechenden Aggregate. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten embryologischer Arbeiten, die die Auswirkungen von Noggin und verschiedener weiterer BMP-Antagonisten, die wie Noggin selbst extrazellulär BMPs binden, in vivo untersucht haben. Mäuse mit herunterregulierter Nogginexpression weisen eine Überaktivierung verschiedener BMPs im Knorpel auf (Tsumaki et al., 2002), die komplette Inaktivierung von Noggin führt zu überschießendem Knorpelwachstum, schweren Skelettmalformationen und frühem postnatalen Tod, anatomisch fanden sich hier z.B. kürzere Knochen, teilweise fehlende Skelettanteile sowie auch das Fehlen kompletter Gelenke (Brunet et al., 1998; McMahon et al., 1998; Tsumaki et al., 2002; Wijgerde et al., 2005). Auf der anderen Seite kommt es bei Überexpression von Noggin zu einer Reduktion bzw. zum kompletten Fehlen von hypertrophen Zellen, die Chondrozyten erscheinen zudem unreif und kaum differenziert, außerdem waren diese Zellen nicht mehr in der Lage, Kollagen Typ X zu exprimieren (Pathi et al., 1999). Diese deutliche Inhibition der Hypertrophie und

terminalen Differenzierung führt folgerichtig zum Fehlen großer Anteile des Skeletts (Tsumaki et al., 2002), wenn dies zu einem sehr frühen Zeitpunkten der Extremitätenentwicklung geschieht, sogar zur vollständigen Blockade der Knorpelbildung (Pathi et al., 1999). Noggin ist darüber hinaus z.B. auch an der korrekten Entwicklung von Anteilen des Innenohres (Bok et al., 2007) sowie des Herzens beteiligt (Choi et al., 2007). Eine kürzlich durchgeführte Studie belegte außerdem erstmals einen Einfluß von Noggin als Induktor der Adipogenese und möglicherweise der Fettleibigkeit sowie einen Zusammenhang zwischen erhöhter Nogginexpression und einem erhöhten Fettanteil im Knochenmark bei gleichzeitig herabgesetzter Knochendichte (Sawant et al., 2012). Im Menschen führen Missense-Mutationen im Noggin-Gen zu zwei autosomal dominanten Erkrankungen, dem Multiple-Synostose-Syndrom sowie dem proximalen Symphalangismus (Marcelino et al., 2001). Auch bei anderen BMP-Antagonisten werden diese schwerwiegenden Veränderungen gefunden. So führt die Überexpression von Chordin zu einer verzögerten Chondrozytenreifung und einer Verringerung der Gliedmaßenlänge im sich entwickelnden Skelett von bis zu 40% (Zhang et al., 2002), Gremlin-Knockoutmäuse zeigten eine überschießende Knochenbildung, während eine Überexpression von Gremlin zu Osteopenie, also einer reduzierten Knochendichte, führt (Gazzerro et al., 2005; Gazzerro et al., 2007). Dabei sind diese BMP-Antagonisten nicht jeweils allein für bestimmte Vorgänge zuständig, vielmehr ist ein geregeltes Zusammenspiel mehrerer Faktoren zu beobachten, in der Embryogenese wurde beispielsweise eine Kooperation von Noggin und Gremlin beim Erhalt von Zonen mit reduziertem BMP-Signaling während der Spezifikation der Sklerotome im frühen Somiten nachgewiesen (Stafford et al., 2011).

Während in den chondrogenen Aggregaten die Zugabe von Noggin zum Kulturmedium insgesamt keinerlei Einfluß auf die Zellen hatte, weder die histologischen Färbungen noch die Genexpressionsanalysen zeigten dementsprechende, signifikante Veränderungen der verschiedenen Kollagentypen bzw. Veränderungen innerhalb der einzelnen Kulturbedingungen, war jedoch in den mit Noggin behandelten hypertrophen Aggregaten interessanterweise auch eine mit steigender Nogginkonzentration abnehmende Färbung in der Immunhistochemie von Kollagen Typ II zu beobachten, mit zum Teil großen, ungefärbten Arealen in den Schnitten als Ausdruck einer Dedifferenzierung dieser Zellen. Folgerichtig war dann auch die Genexpression von Kollagen Typ II in dieser Gruppe herabgesetzt. Daß

chondrogen differenzierende MSCs auch mit der Einwirkung von Noggin ihren chondrogenen Status erhalten, in den hypertroph differenzierenden Zellen jedoch, den Ergebnissen in den chondrogenen Gruppen eigentlich widersprechend, auch eine Beeinträchtigung von Kollagen Typ II zu beobachten ist und die Zellen dedifferenzieren, könnte mit der erwähnten Dominanz der Signalgebung von TGF- β zusammenhängen, da TGF- β augenscheinlich alleine in der Lage ist, die knorpelspezifischen Matrixkomponenten Kollagen Typ II und Aggrecan und somit den chondrogenen Phänotyp zu erhalten (Li et al., 2005; Freyria et al., 2012). Da im hypertrophen Medium sowohl dieser chondrogen stabilisierende Faktor nicht mehr enthalten ist und mit der Inhibition der Hypertrophie auch der zweite Differenzierungsweg der Zellen wirksam blockiert wurde, dürfte dies die Ursache für diese Befunde sein.

Hypertrophiespezifische Marker werden *in vitro* allerdings nicht ausschließlich in den hypertrophen Kulturbedingungen gefunden. Johnstone et al. (1998) berichten vom Nachweis von mRNA für Kollagen Typ X an Tag 7 nach Bildung der Aggregate, in ihrem Modell wurde außerdem nach Induktion der Chondrogenese auch ein Anstieg der alkalischen Phosphatase im Medium festgestellt. Pelttari et al. (2006) konnten bereits zwei Tage nach Induktion der chondrogenen Differenzierung in MSCs das Vorhandensein von Kollagen Typ X nachweisen, sogar noch vor dem Nachweis von Kollagen Typ II. Dies korreliert mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche. Auch in unseren chondrogenen Gruppen kann eine ALP-Aktivität im Kulturmedium sowie eine Genexpression von Kollagen Typ X beobachtet werden, im Vergleich mit den hypertrophen Gruppen allerdings in geringerem Ausmaß. Diese Befunde werden auch durch die Anwesenheit von Noggin im Kulturmedium nicht beeinflusst, selbst bei höheren Nogginkonzentrationen sind beide Marker unverändert nachweisbar, was das von Pelttari et al. beobachtete Phänomen erklären würde, daß in chondrogen vordifferenzierten MSCs mehrere Wochen nach deren ektopischer Implantation *in vivo* Veränderungen gefunden wurden, die eher dem Verlauf der endochondralen Ossifikation entsprechen. In den meisten Pellets bildeten sich kleine Ossikel und es zeigte sich eine extensive Matrixkalzifizierung sowie Gefäßeinsprossungen wohingegen zeitgleich implantierte Chondrozytenpellets derartige Änderungen nicht aufwiesen, sondern durchweg stabilen Knorpel formten. Diese Beobachtungen bedeuten, daß in chondrogen differenzierenden MSCs neben

TGF- β und BMP offensichtlich noch andere Einflussfaktoren beteiligt sind (Pelttari et al., 2006).

Darüber hinaus zeigten sich in der ALP-Färbung der histologischen Schnitte der chondrogenen Aggregate vereinzelte ALP-positive Zellen im gesamten Pellet unter Betonung der Randbereiche. Yoo et al. fanden in den Experimenten zur Etablierung ihres Chondrogenesemodells in der Peripherie der Aggregate ebenfalls mehrere Lagen abgeflachter Zellen, die das Aggregat ähnlich einem Perichondrium umgeben und in denen keine chondrogene Differenzierung stattgefunden hat. Diese Zellen produzierten lediglich Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Typ X konnten hier nicht nachgewiesen werden, so daß die Vermutung geäußert wurde, daß es sich hierbei um eigenständige, fibroblastenähnliche Zellen handelt, die während des Prozesses der Aggregatbildung größtenteils in die Peripherie gewandert sind (Yoo et al., 1998). Vergleichbare Beobachtungen konnten bereits vorher in Aggregaten in High-Cell-Density- und Suspensionskulturen mit Zellen embryonaler Gliedmaßenknospen von Hühnern gemacht werden (Osdoby et al., 1979; Tacchetti et al., 1987; Tavella et al., 1994). Dieser Befund hängt möglicherweise auch mit der eingangs erwähnten Heterogenität der aus dem Knochenmark isolierten Zellpopulation zusammen und auch in unseren Versuchen dürften die ALP-positiven Zellen eher diesem fibroblastenähnlichen Zelltyp entsprechen als wirklich hypertrophierten Zellen.

4.4 Bedeutung der Ergebnisse für die MSC-Chondrogenese

Wie sich gezeigt hat, ist die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen in vitro ein komplexer Prozeß, der verschiedene Wachstumsfaktoren benötigt, die ihrerseits wiederum sehr spezielle Rollen im komplizierten Gefüge der beteiligten Regelkreise einnehmen. Der Erfolg der chondrogenen Differenzierung hängt dabei auch von der isolierten Stammzellpopulation ab, da die in verschiedenen Differenzierungsstadien vorliegenden Zellen möglicherweise unterschiedlich auf die Zugabe bzw. den Entzug bestimmter Wachstumsfaktoren im Kulturmedium reagieren, die offensichtlich dominante Rolle von TGF- β als chondrogen stabilisierendem Faktor wurde in diesem Zusammenhang schon erwähnt. Für sezernierte Wachstumsregulatoren wie Noggin wurde dabei außerdem gezeigt, dass Menschen und Mäuse unterschiedlich hohe Dosen Noggin benötigen, was daran liegen mag, dass die Skelettelemente bei

Menschen größer sind und eine längere Entwicklungsdauer haben und möglicherweise deshalb mehr Nogginprotein nötig ist, um einen wirksamen Gradienten über eine größere (Knochen-)Distanz bzw. einen längeren Zeitraum zu erhalten (Marcelino et al., 2001). Dies könnte bei einem Transfer vom Tierversuch zu einem Einsatz beim Menschen entsprechende Modifikationen erfordern. Denkbar wären insgesamt auch divergierende Ergebnisse bei unterschiedlichen Stammzellspendern aufgrund jeweils variierender Zellpopulationen. Ideal wäre eine möglichst weitgehende Optimierung und Standardisierung der jeweiligen Kulturbedingungen *in vitro*, insbesondere im Hinblick auf eine bessere Vergleichbarkeit zukünftiger Untersuchungen.

Zusammenfassend konnte in den hier durchgeführten Versuchen durch die Änderung von chondrogenen zu hypertrophen Kulturbedingungen eine deutliche Hypertrophie in den Aggregaten induziert werden. Diese T3-induzierte Hypertrophie in chondrogen differenzierenden MSCs kann durch den Einsatz von Noggin in einer dosisabhängigen Art und Weise suffizient unterdrückt werden. Im chondrogenen Medium hatte Noggin keinerlei Auswirkungen auf den chondrogenen Phänotyp der Zellen, allerdings fand sich hier auch eine Expression hypertrophiespezifischer Marker wie Kollagen Typ X, welche auch durch die Anwesenheit von Noggin im Medium nicht unterdrückt wurden. Dieser Befund unterstützt die Beobachtungen, dass in den momentan verwendeten Kulturbedingungen in chondrogen differenzierenden MSCs ein Entwicklungsprogramm abläuft, welches der endochondralen Ossifikation ähnelt (Müller et al., 2010) und liefert eine Erklärung, warum die Stammzellen nach Implantation *in vivo* hypertrophieren und ossifizieren (Pelttari et al., 2006). Dieser Zustand ist auf der einen Seite günstig für die Verwendung mesenchymaler Stammzellen in der kurativen Therapie knöcherner Verletzungen, da Knochenbrüche im Rahmen der sekundären Frakturheilung ebenfalls über die Ossifikation eines temporären, hypertrophierenden Knorpels ausheilen und es wurde hier über erfolgreich verlaufene klinische Anwendungen berichtet (Hesse et al., 2007; Scotti et al., 2010; Farrell et al., 2011), für die Anwendung im Tissue Engineering im Bereich der Knorpelregeneration wirft diese Charakteristik chondrogen differenzierender MSCs jedoch Bedenken auf. Zwar gibt es auch beim klinischen Einsatz von MSCs in der Knorpeltherapie bereits Resultate, in denen ein Knorpeldefekt mittels aus dem Knochenmark gewonnener MSCs erfolgreich therapiert wurde (Kuroda et al., 2007; Wakitani et al., 2007), dieselben

Autoren konnten in einer unlängst ausgewerteten Langzeitstudie darüber hinaus die anfänglichen Befürchtungen einer möglichen tumorösen Entartung transplanteder mesenchymaler Stammzellen fürs Erste zerstreuen (Wakitani et al., 2011), dennoch bildete sich in diesem Fall im Bereich des Knorpeldefektes kein hyaliner, sondern lediglich Faserknorpel. Das Ziel des Tissue Engineering für die erfolgreiche und langzeitige Therapie von Knorpeldefekten ist aber nicht ein transienter Knorpel, wie er in der endochondralen Ossifikation zu finden ist, sondern muss die Stabilisierung des chondrogenen Phänotyps als Voraussetzung für die Generierung eines stabilen hyalinen Knorpels sein (Müller et al., 2010).

Um dies zu erreichen, kann es auch von Vorteil sein, bereits bestehende Methoden zu verknüpfen, beispielsweise die Kombination von Stammzell- mit Gentherapie. Steinert et al. (2007) berichten vom Einsatz verschiedener Transgene wie z.B. IGF-1, FGF-2 und SOX-9 in modifizierten Zellen bei der Therapie von Knorpeldefekten. Auch für Noggin gibt es derartige in vivo-Versuche im Tiermodell. Hannallah et al. (2004) transduzierten aus Muskel gewonnene Stammzellen mit einem von ihnen entwickelten retroviralen Vektor, der das für menschliches Noggin kodierende Gen trug. Hiermit konnten sie die heterotope Ossifikation, die von BMP-4 transduzierten Zellen hervorgerufen wurde, wirksam inhibieren. Auch der Einsatz bzw. eine mögliche Kombination mehrerer Faktoren im Differenzierungsmedium ist denkbar. Für PTHrP beispielsweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass es zwar im hypertrophen Medium eine Hypertrophie der MSCs nicht verhindern kann, im chondrogenen Medium jedoch zu einer Verringerung der ALP-Aktivität führt und somit hilfreich für den Erhalt des chondrogenen Phänotyps in diesen Kulturbedingungen sein kann (Müller et al., 2013). Vor dem Hintergrund der Komplexität der beteiligten Signalwege werden jedoch weitergehende Untersuchungen nötig sein, um die entscheidenden Abläufe genau zu verstehen, insbesondere die Verabreichungsmethoden, die Expressionsdauer der verabreichten Faktoren sowie Art und Dosis müssen für einen erfolgreichen in vivo-Einsatz beim Menschen gut überlegt und verstanden sein (Steinert et al., 2007).

Einschränkend für die vorliegende Arbeit muss erwähnt werden, dass die hier durchgeführten Versuche ausschließlich in vitro in einem definierten Medium erfolgten. Nach der Implantation in vivo sind die Zellen jedoch vielfältigen biochemischen Einflüssen ausgesetzt, insbesondere die Exposition zu T3 muss hier angeführt werden. Des Weiteren wurde Noggin hier erst ab Tag 14, nach der

chondrogenen Vordifferenzierungsphase der Zellen, zugegeben. Möglicherweise führt eine Nogginzugabe zum Medium zu einem anderen/früheren Zeitpunkt bzw. eine Veränderung der Differenzierungsphasen oder der Einwirkungsdauer von Noggin auch zu abweichenden Ergebnissen im Vergleich zu den hier gewonnenen Resultaten, insbesondere hinsichtlich der Expression der Hypertrophiemarker.

Insgesamt stellen mesenchymale Stammzellen jedoch eine vielversprechende Zellquelle für einen zukünftigen, breiten Einsatz in unterschiedlichen Feldern der regenerativen Medizin dar, auch im Bereich der Knorpelersatztherapie, wenn es gelingt, den chondrogenen Phänotyp während der *in vitro*-Chondrogenese und für den Einsatz *in vivo* zu stabilisieren. Strategien, die die Expression der Hypertrophie während der MSC-Chondrogenese verhindern, sind daher eindeutig notwendig und trotz der erwähnten Einschränkungen sind die extrazellulären BMP-Antagonisten wie Noggin hier sicherlich ein möglicher Ansatzpunkt.

5 Zusammenfassung

Sportlich und alters- bzw. degenerativ bedingter Verschleiß der hyalinen Knorpelkappen der Gelenke gehört heutzutage zu den häufigsten Erkrankungen weltweit, die sich hieraus ergebenden volkswirtschaftlichen Schäden sind enorm.

Aufgrund seiner anatomischen Beschaffenheit und einer hiermit einhergehenden, im Vergleich zu anderen Gewebearten äußerst schlechten Regenerationsfähigkeit, ist einmal beschädigter Gelenkknorpel kaum mehr in der Lage, sich selbständig zu regenerieren, körpereigene Reparaturprozesse führen in der Regel lediglich zu minderwertigem Faserknorpel, der den mechanischen Anforderungen in den Gelenken nicht genügt. Auch die momentan angewendeten chirurgischen Maßnahmen bieten derzeit noch nicht die Möglichkeit, dem natürlichen Gelenkknorpel vergleichbare, funktionell hochwertige Ersatzgewebe zu generieren und den Patienten eine dauerhafte Beschwerdebesserung zu gewährleisten.

Im Bereich des Tissue Engineering haben sich in den letzten Jahren humane mesenchymale Stammzellen aufgrund ihrer relativ einfachen Isolierungsmöglichkeit sowie ihrer Fähigkeit, unter anderem chondrogen zu differenzieren, als vielversprechende Zellquelle für eine eventuelle Entwicklung derartiger Ersatzgewebe herausgestellt. Diese chondrogene Differenzierung kann in vitro in unterschiedlichen Chondrogenesemodellen induziert und untersucht werden, jedoch hat sich hier gezeigt, dass chondrogen differenzierende MSCs neben charakteristischen chondrogenen Markern wie Kollagen Typ II auch hypertrophieassoziierte Marker wie Kollagen Typ X und ALP exprimieren. Dies lässt vermuten, dass die chondrogene Differenzierung der MSCs in vitro vergleichbaren regulatorischen Mechanismen und Entwicklungsphasen folgt, wie sie in der endochondralen Ossifikation während der embryonalen Skelettentwicklung gefunden wird, in deren Verlauf die Chondrozyten hypertrophieren, schlussendlich apoptotisch werden und das Gewebe ossifiziert. Für die Herstellung von Knorpelersatzprodukten zur Behandlung von Knorpeldefekten ist diese Entwicklung jedoch höchst bedenklich, da die Voraussetzung hierfür die Stabilisierung des chondrogenen Phänotyps ist und hypertrophierende Zellen für derartige Ersatzgewebe ungeeignet sind. Insbesondere den BMPs (bone morphogenetic proteins) kommt dabei im

komplexen Zusammenspiel einer Vielzahl unterschiedlicher Regelkreise eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Hypertrophie zu.

Ziel dieser Studie war die Untersuchung des BMP-Antagonisten Noggin, bzw. der Einfluß von Noggin auf die chondrogen differenzierenden MSCs in vitro und insbesondere inwieweit die Hypertrophie in diesen Zellen in Anwesenheit von Noggin im Kulturmedium beeinflusst bzw. unterdrückt werden kann. Hierzu wurden die MSCs in einem Pelletkulturmodell in einem definierten Medium mit u.a. TGF- β und Dexamethason 14 Tage lang chondrogen vordifferenziert, im Anschluß wurde in einem Teil der Zellen durch Entzug von TGF- β und Dexamethason sowie Zugabe des Schilddrüsenhormones T3 zum Medium die Hypertrophie angebahnt. Weiterhin wurden sowohl die in chondrogenem Medium belassenen, als auch die in hypertrophes Medium überführten Aggregate mit unterschiedlich hohen Dosen Noggin behandelt. Nach weiteren 14 Tagen wurden die Zellen dann histologisch untersucht, weiterhin wurde die Genexpression bestimmter Marker mittels PCR ermittelt. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen deutlich, daß Noggin in der Lage ist, die T3-induzierte Hypertrophie in MSCs in vitro dosisabhängig zu inhibieren.

Zusammenfassend weist dies darauf hin, daß die Beeinflussung des BMP-Signalweges mittels extrazellulärer BMP-Antagonisten wie Noggin ein möglicher Weg zur Verhinderung der Hypertrophie in der in vitro-Chondrogenese von MSCs und damit die Basis für die Herstellung MSC-basierter Knorpelersatzprodukte sein kann.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
ALK	Activin receptor-like Kinase
ALP	Alkalische Phosphatase
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor
BMP	Bone morphogenetic protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMMB	Dimethylmethylenblau
EZM	Extrazellulärmatrrix
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factor
GH	Growth hormone
hMSC	Humane mesenchymale Stammzellen
IGF	Insulin like growth factor
Ihh	Indian hedgehog
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite solution
MMP	Matrixmetalloproteinase
MSC	Mesenchymale Stammzellen
N-CAM	Neural cell adhesion molecule
PCR	Polymerase chain reaction
PTHrP	Parathyroid hormone related protein
RNA	Ribonucleic acid
RunX	Runt-related transcription factor
sGAG	sulfatiertes Glykosaminoglykan
SOX	Sry-related high mobility group box
T3	Triiodthyronin
TGF	Transforming growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

7 Literaturverzeichnis

Aglietti P, Ciardullo A, Giron F, Ponteggia F: **Results of Arthroscopic Excision of the Fragment in the Treatment of Osteochondritis Dissecans of the Knee.** *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 2001; 17: 741-746.

Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF: **The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6.** *Genes Dev* 2002; 16:2813-2828

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **The extracellular matrix of animals.** *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition 2002

Anderson HC: **Molecular biology of matrix vesicles.** *Clin Orthop.* 1995; 314:266-280

Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B.: **Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge.** *Tissue Eng.* 1999; Dec;5(6):545-54.

Angele P, Zellner J, Englert C, Nerlich M: **Möglichkeiten der modernen Gelenkknorpelchirurgie : Mikrofrakturierung, osteochondrale Transplantation.** *Aktuelle Traumatologie* 2005; 35: 255-259.

Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P: **Development of synovial joints.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69:144-155

Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M: **Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo.** *Clin Orthop Relat Res.* 1980; Sep;(151):294-307.

Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB: **TGF- β 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteinases.** *Dev Biol* 1993; 158(2): 414-429

Ballock RT, Reddi AH: **Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium.** *The Journal of Cell Biology* 1994; 126(5): 1311-1318

Ballock RT, O'Keefe RJ: **The Biology of the growth plate.** *The Journal of Bone & Joint Surgery* 2003; 85(4):715-726

Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM: **Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components.** *Exp Cell Res* 2001; 268: 189-200

Benthien JP, Behrens P: **Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC) Combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing.** *Cartilage* 2010; doi: 10.1177/1947603509360044.

Bert JM: **Abrasion arthroplasty.** *Operative Techniques in Orthopaedics* 7; 1997: 294-299.

Binette F, McQuaid DP; Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM, Tubo R: **Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro.** *J Orthop Res* 1998; 16:207-216

Bhosale AM, Richardson JB: **Articular cartilage: structure, injuries and review of management.** *British Medical Bulletin* 2008; 87 (1):77-95

Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H: **Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.** *Stem Cells* 2004; 22: 625-634.

Böhme K, Conscience-Egli M, Tschan T, Winterhalter KH: **Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine.** *The Journal of Cell Biology* 1992; Vol.116, No.4: 1035-1042

Bok J, Brunet LJ, Howard O, Burton Q, Wu DK: **Role of hindbrain in inner ear morphogenesis: Analysis of Noggin knockout mice.** *Dev Biology* 2007;311:69-78

Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P: **Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads.** *Exp Cell Res.* 1994 May;212(1):97-104.

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al.: **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.** *The New England Journal of Medicine* 1994; 31: 889-895.

Bruckner P, Hörler I, Mendler M, Houze Y, Winterhalter KH, Eich-Bender SG, Spycher MA: **Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture.** *The Journal of Cell Biology*, 1998; 109:2537-2545

Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM: **Noggin cartilage morphogenesis and joint formation in the mammalian skeleton.** *Science* 1998; 280:1455-1457

Buckwalter JA, Mankin HJ: **Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation.** *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1997; 79A: 612-632.

Buckwalter JA, Mankin HJ: **Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.** *Instr Course Lect* 1998;47:477-86.

Breinan HA, Hsu HP, Spector M: **Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines.** *Clin Orthop* 2001; (391 Suppl):S219-230

Burr DB: **The Importance of Subchondral Bone in the Progression of Osteoarthritis.** *The Journal of Rheumatology* 2004; 31: 77-80.

Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R: **Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone.** *Matrix Biology* 2003; 22: 81-91.

Caplan AI: **Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics.** *Tissue Engineering* 2005; 1(7-8): 1198-1211.

Carney SL, Muir H: **The structure and function of cartilage proteoglycans.** *Physiol Rev* 1988; 68:858-910.

Chen FH, Tuan RS: **Mesenchymal stem cells in arthritic diseases.** *Arthritis Research & Therapy* 2008; 10:223

Chimal-Monroy J, Rodriguez-Leon J, Montero JA, Ganan Y, Macias D, Merino R, Hurler JM: **Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: sox genes and BMP signaling.** *Dev Bio* 2003; 257:292-301

Choi M, Strottmann RW, Yang YP, Meyers EM, Klingensmith J: **The bone morphogenetic protein antagonist Noggin regulates mammalian cardiac morphogenesis.** *Circ Res* 2007; 100:220-228.

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ: **Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells.** *PNAS USA* 2001 98: 7841-7845.

Davies SR, Sakano S, Zhu Y, Sandell LJ: **Distribution of the transcription factors SOX9, AP-2 and δ EF1 in adult murine and meniscal cartilage and growth plate.** *J Histochem Cytochem* 2002; 50:1059-1065

De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP: **Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo.** *Arthritis & Rheumatism* 2004; Vol. 50, No.1:142-150

Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP: **Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo.** *Arthritis & Rheumatism* 2001; Vol. 44, No. 7: 1608-1619

De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, Mericq V Baron J: **Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein 2.** *Endocrinology* 2001; 142:430-436

Diekman BO, Rowland CR, Lennon DP, Caplan AI, Guilak F: **Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix.** *Tissue Eng Part A*. 2010 Feb;16(2):523-33.

Engelhardt M: **Epidemiologie der Arthrose in Westeuropa.** *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 2003 Jahrgang 54, Nr. 6: 171-175

Estes BT, Wu AW, Guilak F: **Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6.** *Arthritis Rheum* 2006, 54:1222-1232.

Eyre DR, Wu JJ, Apone S: **A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types.** *J Rheumatol* 1987; 14:25-27

Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ: **Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue.** *Biochem Biophys Acta*. 1986 Sep 4;883(2):173-7

Farrell E, Both SK, Odörfer KI, Koevoet W, Kops N, O'Brien FJ, Baatenburg de Jong RJ, Verhaar JA, Cuijpers V, Jansen J, Erben RG, van Osch GJ: **In-vivo generation of bone via endochondral ossification by in-vitro chondrogenic priming of adult human and rat mesenchymal stem cells.** *BMC Musculoskelet Disord* 2011; 12:31

Ferguson CM, Schwarz EM, Reynolds PR, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ: **Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta-1-induced inhibition of chondrocyte maturation.** *Endocrinology* 2000; 141(12): 4728-4735

Flik KR, Verma N, Cole BJ, Bach BR: **Articular cartilage – Structure, Biology and Function.** *Cartilage Repair Strategies* 1-12 2007; doi: 10.1007/97815974534311.

Freyria AM, Mallein-Gerin F: **Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors.** *Injury, Int. J. Care Injured* 2012; 43: 259-265

Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Madry H, Cucchiaroni M: **Current progress in stem cell-based gene therapy for articular cartilage repair.** *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2015; Vol. 10, No. 1

Gazzerro E, Pereira RC, Jorgetti V, Olson S, Economides AN, Canalis E: **Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia.** *Endocrinology* 2005; 146:655-665

Gazzerro E, Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, Stadmeyer L, Durant D, Economides AN, Canalis E: **Conditional deletion of gremlin causes a transient increase in bone formation and bone mass.** *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282:31549-31557

Girkontaite I, Frischholz S, Lammi P et al.: **Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies.** *Matrix Biol* 1996; 15:231-238

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K: **The control of chondrogenesis.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; 97:33-44

Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Reynolds PR, Roiser RN, O'Keefe RJ: **BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation.** *J Bone Miner Res* 1999; 14:475-482

Hangody L, Fules P: **Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience.** *J Bone Joint Surg Am* 85 2003; (2):25-32.

Hannallah D, Peng H, Young B, Usas A, Gearhart B, Huard J: **Retroviral delivery of Noggin inhibits the formation of heterotopic ossification induced by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in an animal model.** *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86(1):80-91

Hardingham T, Tew S, Murdoch A: **Tissue engineering: chondrocytes and cartilage.** *Arthritis Res* 2002; 4(suppl 3):63-68

Heng BC, Cao T, Lee EH: **Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro.** *Stem cells* 2004;22:1152-1167

Hesse E, Kluge G, Atfi A, Correa D, Haasper C, Berding G, Shin HO, Viering J, Länger F, Vogt PM, Krettek C, Jagodzinski M: **Repair of a segmental long bone defect in human by implantation of a novel multiple disc graft.** *Bone* 2010; 46(5):1457-1463

Hogan BL: **Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development.** *Genes Dev* 1996; 10:1580-1594

Hunter W: **Of the structure and diseases of articulating cartilage.** *Philos Trans R Soc* 1743; 42:514-521

Hunziker EB: **Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects.** *Osteoarthritis and Cartilage* 2001; 10, 432–463

Ichinose S, Yamagata K, Sekiya I, Muneta T, Tagami M: **Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells.** *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005; Jul;32(7):561-70.

Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, Chung UI: **The combination of SOX5, SOX6 and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage.** *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50:3561-3573

Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A: **Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 320:914-919.

Jakobsen RB, Shahdadfar A, Reinholt FP, Brinchmann JE: **Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue.** *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Oct;18(10):1407-16

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU: **In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.** *Experimental Cell Research* 1998; 238:265-272

Johnstone B, Yoo JU: **Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair.** *Clin Orthop Relat Res* 1999; 367:156-162

Johnstone B, Alini M, Cucchiaroni M, Dodge GR, Eglin D, Guilak F, Madry H, Mata A, Mauck RL, Semino CE, Stoddart MJ: **Tissue engineering for articular cartilage repair – the state of the art.** *European Cells and Materials*, 2013; Vol. 25: 248-267

Jubel A, Andermahr J, Koebeke J, Häuselmann HJ, Rehm KE: **Die Therapie von Gelenkknorpeldefekten.** *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127: 1904–1908

Karl A: **The role of BMP and TGF- β signaling in the terminal differentiation in the in-vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells.** Dissertation, Regensburg 2013.

Karl A, Olbrich N, Pfeiffer C, Berner A, Zellner J, Kujat R, Angele P, Nerlich M, Müller B: **Thyroid hormone-induced hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis is mediated by bone morphogenetic protein-4.** *Tissue engineering* 2014; 1 and 2:178-188.

Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Lowe ET, Hardingham TE: **Bone marrow derived mesenchymal stem cells express the pericyte marker 3G5 in culture and show enhanced chondrogenesis in hypoxic conditions.** *J Orthop Res* 2010, 28:834-840.

Kim HK, Moran ME, Salter RB: **The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits.** *J Bone Joint Surg Am.* 1991; 73(9):1301-15

Kingsley DM: **The TGF-beta superfamily: new members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms.** *Genes Dev* 1994; 8:133-146

Kolf CM, Cho E, Tuan RS: **Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.** *Arthritis Research & Therapie* 2007; doi: 10.1186/ar2116

Kuboki T, Kanayama M, Nakanishi T et al.: **Cbfa1/RUNX2 gene expression in articular chondrocytes of the mice temporomandibular and knee joints in vivo.** *Arch Oral Biol* 2003; 48:519-525

Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mitsuno K, Ohgushi H, Wakitani S, Kurosaka M: **Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone marrow stromal cells.** *Osteoarthritis and Cartilage* 2007; 15(2):226-231

Lange C, Schroeder J, Lioznov MV, Zander AR: **High-Potential Human Mesenchymal Stem Cells.** *Stem Cells and Development* 2005;14: 70–80.

Lefebvre V, Smits P: **Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation.** *Birth Defects Research* 2005; 75:200-212

Li TF, O'Keefe RJ, Chen D: **TGF- β signaling in chondrocytes.** *Front Biosci.* 2005; 10:681-688

Li TF, Darowish M, Zuscik MJ, Chen D, Schwarz EM, Rosier RN, Drissi H, O'Keefe R: **Smad3-deficient chondrocytes have enhanced BMP-signaling and accelerated differentiation.** *J Bone Miner Res.* 2006; 21:4-16

Li WJ, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS: **A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells.** *Biomaterials* 2005; 26:599-609

Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: **Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis.** *Neuron* 2000; 28:713-726

Lin Z, Gao C, Ning Y, He X, Wu W, Chen YG: **The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/ β -catenin signaling.** *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283:33053-33058

Lisignoli G, Cristino S, Piacentini A, Toneguzzi S, Grassi F, Cavallo C, Zini N, Solimando L, Maraldi NM, Facchini A: **Cellular and molecular events during chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells grown in a three-dimensional hyaluronan based scaffold.** *Biomaterials* 2005; 26:5677-5686

Mackay A, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF: **Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow.** *Tissue engineering* 1998; 4:415-428

Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M: **Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton.** *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008; 40: 46-62

Maetzel A, Li L, Pencharz J, Tomlinson G, Bombardier C: **The economic burden associated with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and hypertension: a comparative study.** *Ann Rheum Dis.* 2004; 63 (4): 395-401

Mankin HJ: **The response of articular cartilage to mechanical injury.** *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64:460-466.

Mankin HJ: **The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts).** *N Engl J Med* 1974, 291: 1285-1292

Mankin HJ, Thrasher AZ: **Water content and binding in osteoarthritic human cartilage.** *J Bone Joint Surg Am* 1975; 57:76-80.

Marcelino J, Sciortiona CM, Romero MF, Ulatowski LM, Ballock TR, Economides AN, Eimon PM, Harland RM, Warman ML: **Human disease-causing NOG missense mutations: Effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding.** *Dev Biology* 2001; 98(20):11353-11358

Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V: **Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation.** *European Journal of Radiology* 2006; 57: 24-31

Matsuda C, Takagi M, Hattori T, Wakitani S, Yoshida T: **Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to chondrocytes for construction of three-dimensional cartilage tissue.** *Cytotechnology* 2005; doi: 10.1007/s10616-005-3751-x

McMahon JA, Takada S, Zimmermann LB, Fan CM, Harland RM, McMahon A: **Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite.** *Genes & Dev* 1998; 12:1438-1452

Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaiser S, Finkenzeller G, Stark GB, Südkamp NP, Schmal H: **Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue.** *Tissue Eng.* 2006 Oct;12(10):2853-62.

Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P: **Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI.** *J Cell Biol* 1989; 108:191-197

Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganan Y, Economides AN, Hurler JM: **The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb.** *Development* 1999; 126:5515-5522

Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A: **Interaction of FGF, Ihh/Pthlh and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation.** *Dev Cell* 2002; 3:439-449

Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A: **BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation.** *Development* 2001; 128:4523-4534

Müller MB, Tuan RS: **Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells.** *Arthritis & Rheumatism* 2008; 58: 1377-1388

Müller MB, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, Kujat R, Nerlich M, Tuan RS, Angele P: **Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF β isoforms and chondrogenic conditioning.** *Cells Tissue Organs* 2010; 192_158-166

Müller M, Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Kujat R, Prantl L, Nerlich M, Tuan RS, Angele P: **Effect of parathyroid hormone-related protein in an in vitro hypertrophy model for mesenchymal stem cell chondrogenesis.** *International Orthopaedics* 2013; 37:945-951

Mwale F, Stachura D, Roughley P, Antoniou J: **Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation.** *J Orthop Res.* 2006 Aug;24(8):1791-8.

Nathansan MA: **Transdifferentiation of skeletal muscle into cartilage: transformation or differentiation?** *Curr Top Dev Biol* 1986; 20:39-62

Nifuji A, Noda M: **Coordinated expression of noggin and bone morphogenetic proteins during early skeletogenesis and induction of noggin expression by BMP7.** *Journal of Bone and Mineral Research* 1999; 14:2057-2066

Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J: **Endocrine regulation of the growth plate.** *Horm. Res.* 2005; 64(4): 157-165

Nöth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS: **In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cell.** *Tissue Eng* 2002; 8:131-144

Osdoby P, Caplan AI: **Osteogenesis in cultures of limb mesenchymal cells.** *Devel. Biol.* 1979; 73:84-102.

Outerbridge HK, Outerbridge RE, Smith DE: **Osteochondral Defects in the Knee: A Treatment Using Lateral Patella Autografts.** *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2000; 377: 145-151.

Pacifici M, Koyama E, Shibukawa Y, Wu C, Tamamura Y, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M: **Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation.** *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1068:74-86

Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, Vortkamp A: **Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation.** *Dev Biology* 1999; 209:239-253

Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W: **Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human**

mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis & Rheumatism* 2006; 54:3254-3266

Phimphilai M, Zhao Z, Boules H, Roca H, Franceschi RT: **BMP signaling is required for RUNX²-dependent induction of the osteoblast phenotype.** *J Bone Miner Res* 2006; 21:637-646

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al.: **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science* 1999 284: 143-147.

Pointe Scientific Inc: www.pointescientific.com/products/PI/A7505.pdf. Manual für den Gebrauch des ALP-Reagenz Sets

Potier E, Noailly J, Ito K: **Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics.** *J Biomech* 2010, 43:807-817.

Prydz K, Dalen KT: **Synthesis and sorting of proteoglycans.** *Journal of Cell Science* 2000; 113: 193-205.

Pullig O, Pfander D, Swoboda B: **Molecular principles of induction and progression of arthrosis.** *Orthopade* 2001; 30:825-33.

Radice M, Brun P, Cortivo R, Scapinelli R, Battaliard C, Abatangelo G: **Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors.** *J Biomed Mater Res.* 2000; May;50(2):101-109.

Reddi AH: **Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN.** *Arthritis Res* 2001; 3:1-5

Rhee DK, Marcelino J, Baker M et al.: **The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth.** *J Clin Invest* 2005; 115:622-631

Rifas L: **The role of noggin in human mesenchymal stem cell differentiation.** *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; 100:824-834

Sawant A, Chanda D, Isayeva T, Tsuladze G, Garvey WT, Ponnazhagan S: **Noggin Is Novel Inducer of Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis.** *Journal of biological Chemistry* 2012; 15:12241-12249

Schewe B, Fritz J, Weise K.: **Knorpelverletzungen am Kniegelenk.** *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 3; 2008: 77-94

Schmitt B, Ringe J, Haupl T, Notter M, Manz R, Burmester GR, Sittinger M, Kaps C: **BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture.** *Differentiation* 2003, 71:567-577.

Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, Lopez-Rios J, Zeller R, Barbero A, Martin I: **Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering.** *PNAS* 2010; 107:7251-7256.

Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ: **In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis.** *Dev Biology* 2002; Vol. 99, No. 7: 4397-4402

Sledge SL: **Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries.** *Clinics in Sports Medicine* 2001; 20: 365-378.

Simkin PA: **A biography of the chondrocyte.** *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1064-1068

Smits P, Li P, Mandel J: **The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation.** *Dev Cell* 2001; 1:277-290

Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI: **Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage.** *J Orthop Res.* 1999; Mar;17(2):205-13.

Song L, Baksh D, Tuan RS: **Mesenchymal stem cell based cartilage tissue engineering: cells, scaffold and biology.** *Cytotherapy* 2004; 6: 596-601

Stafford DA, Brunet LJ, Khokha MK, Economides AN, Harland RM: **Cooperative activity of noggin and gremlin 1 in axial skeleton development.** *Development* 2011; 138:1005-1014

Stalinska L, Ferenc T: **The role of TGF-beta in cell cycle regulation.** *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2005; 59:441-499.

Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK: **Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results.** *Operative Techniques in Orthopaedics* 7: 1997: 294-299.

Steinert AF, Ghivizziani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U: **Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage.** *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:213

Steinert AF, Proffen B, Kunz M, Hendrich C, Ghivizziani SC, Nöth U, Rethwilm A, Eulert J, Evans CH: **Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer.** *Arthritis Research & Therapy* 2009; 11:R148

Tacchetti C, Tavella S, Dozin B, Quarto R, Robino G and Cancedda R: **Cell condensation in chondrogenic differentiation.** *Exp Cell Res* 1992; 200:26-33

Tacchetti C, Quarto R, Nitsch L, Hartmann DJ, Cancedda R: **In vitro morphogenesis of chick embryo hypertrophic cartilage.** *J. Cell Biol*, 1987; 105:999-1006

Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Boileau C, Ranger P, Martel-Pelletier J: **Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and osteoarthritis human chondrocytes and synovial fibroblasts.** *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50:2521-2530

Tavella S, Raffo P, Tacchetti C, Cancedda R, Castagnola P: **N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis.** *Exper. Cell Res.*, 1994; 215:354-362

Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, Kakiuchi M, Kimura T, Ochi T, Yoshikawa H: **Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis.** *J Bone Miner Res* 2002; 17:898-906

Tuan RS, Boland G, Tuli R: **Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering.** *Arthritis Research and Therapy* 2002; 5:32-45

Tuli R, Li WJ, Tuan RS: **Current state of cartilage tissue engineering.** *Arthritis Res Ther* 2003, 5:235-238

Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS: **Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-Cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling crosstalk.** *J Biol Chem* 2003; 278: 41227-41236

van der Mark K: **Structure and Biosynthesis of Collagens.** *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism* 1999; 3-18, Chapter 1. Academic Press.

Volk SW, Luvall P, Leask T, Leboy PS: **A BMP responsive transcriptional region in the chicken type X collagen gene.** *J Bone Miner Res* 1998; 13:1521-1529

Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI: **Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel.** *Tissue Engineering* 1998; 4(4):429-444.

Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H: **Repair of articular cartilage defects in the patella-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees.** *J Tissue Eng Regen Med* 2007; 1(1):74-9

Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H: **Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months.** *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5(2):146-50

Wang X, Manner PA, Horner A et al.: **Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12:963-973

Wijgerde M, Karp S, McMahon J, McMahon AP: **Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse.** *Developmental Biology* 2005; 286: 149-157

Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W: **Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue derived stromal cells.** *Arthritis Rheum* 2003, 48:418-429.

Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX: **TGF- β /Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage.** *J of Cell Biology* 2001; 153(1): 35-46

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B: **The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells.** *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80:1745-1757

Yoon BS, Lyons KM: **Multiple functions of BMPs in chondrogenesis.** *J Cell Biochem* 2004; 93:93-103

Zhang D, Ferguson CM, O'Keefe RJ, Puzas E, Rosier RN, Reynolds PR: **A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification.** *J Bone Miner Res* 2002; 17:293-300

Zimmermann LB, de Jesus-Escobar JM, Harland RM: **The spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein4.** *Cell* 1996; 86:599-606

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al: **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** *Tissue Engineering* 2001; 7: 211-228.

8 Danksagung

An dieser Stelle sei all jenen gedankt, die durch ihre Unterstützung und Hilfestellung wesentlichen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit haben.

Herrn **Prof. Dr. Michael Nerlich** (Abteilung für Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg) für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung.

Herrn **Prof. Dr. Peter Angele** (Abteilung für Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Regensburg) für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Ein ganz herzlicher Dank an **PD Dr. Michael Müller** für die Themenstellung, die Betreuung der Laborarbeit, sowie die äußerst konstruktive Kritik beim schriftlichen Abfassen der Arbeit.

Dem Leiter des Labors der Unfallchirurgie, Herrn **Dr. Richard Kujat**, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfestellung bei mancherlei Problemen.

Ein besonderer Dank an **Daniela Drenkard** und **Alexandra Karl** für die Einführung in die Laborarbeit, die gute Anleitung und die zahlreichen Hilfestellungen während der Versuche, aber auch für die vielen unterhaltsamen Momente während der Zeit im Labor sowie Alex` hilfreiche Tips beim Schreiben des Manuskriptes. Liebe Dani, liebe Alex, ohne eure wertvolle Unterstützung wäre mir die Durchführung dieser Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen!

Frau **Swetlana Stryhskowa** für die Bereitstellung der Medien und Substanzen in der Zellkultur.

Ein besonders herzlicher Dank auch meinen Eltern für die Förderung meines bisherigen Werdeganges und ihr Vertrauen und unermüdliche Unterstützung, die so vieles möglich gemacht hat.

9 Selbständigkeitserklärung

“Ich, Norman Olbrich, geboren am 26.05.1982 in Zschopau, 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.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift des Promovenden