

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR UNFALLCHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. DR. VOLKER ALT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BEDEUTUNG DER PRO- UND ANTIHYPERTROPHEN WIRKUNG DES  
RETINOLSÄUREREZEPTORS  
FÜR DIE TERMINALE DIFFERENZIERUNG CHONDROGEN  
DIFFERENZIERTER, MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Inaugural – Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christina Witzmann

2020



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR UNFALLCHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. DR. VOLKER ALT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

BEDEUTUNG DER PRO- UND ANTIHYPERTROPHEN WIRKUNG DES  
RETINOLSÄUREREZEPTORS  
FÜR DIE TERMINALE DIFFERENZIERUNG CHONDROGEN  
DIFFERENZIIERTER, MESENCHYMALER STAMMZELLEN

Inaugural – Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin der  
Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christina Witzmann

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof Dr. Christian Pfeifer

2. Berichterstatter: PD Dr. Christina Hackl

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2021

# Inhalt

1	Einleitung .....	5
1.1	Hyaliner Knorpel.....	5
1.1.1	Aufbau und Struktur des hyalinen Knorpels.....	6
1.1.2	Knorpelschäden und Reparaturkapazitäten.....	10
1.1.3	Aktuelle Behandlungsoptionen bei Knorpeldefekten.....	12
1.2	Mesenchymale Stammzellen.....	15
1.2.1	Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen .....	16
1.2.2	Hypertrophie der chondrogen differenzierten Stammzellen.....	18
1.3	Endochondrale Ossifikation.....	20
1.4	TGF- $\beta$ -Superfamilie.....	24
1.4.1	TGF- $\beta$ -Signalweg.....	24
1.4.2	BMP-Signalweg .....	27
1.4.3	Transkriptionelle Regulation .....	30
1.5	Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.....	32
1.6	Retinsäure-Signalweg .....	35
2	Ziel der Studie .....	39
3	Material und Methoden .....	41
3.1	Material .....	42
3.1.1	Rekombinante Proteine und Inhibitoren.....	42
3.1.2	Primers .....	43
3.1.3	Antikörper .....	43
3.1.4	Kits.....	45
3.1.5	Puffer und Lösungen .....	46
3.1.6	Zellen.....	51
3.1.7	Zellkultur Medien .....	51
3.2	Methoden .....	52
3.2.1	Zellkultur .....	52
3.2.2	Histologie und Immunhistochemie .....	55
3.2.3	Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase.....	58

3.2.4	Glykosaminoglykangehalt und DNA-Bestimmung .....	58
3.2.5	Analyse der Genexpression.....	60
3.2.6	Protein-Analyse .....	63
3.2.7	Statistische Analyse.....	65
4	Ergebnisse .....	66
4.1	Charakteristische Differenzierung von hMSC's unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen .....	66
4.1.1	Histologische Analyse.....	66
4.1.2	Genexpressions-Analyse .....	69
4.1.3	Glykosaminoglykan-(GAG)gehalt und DNA-Bestimmung.....	71
4.2	Chondrogene Differenzierung unter Einfluss von BMS493 und RA .....	73
4.2.1	Histologische Analyse.....	73
4.2.2	Genexpressions-Analyse .....	76
4.2.3	Glykosaminoglykan-(GAG)gehalt und DNA-Bestimmung.....	78
4.3	Einfluss des Retinsäure-Signalwegs auf Induktion bzw. Hemmung der Hypertrophie in chondrogen differenzierten hMSC's .....	78
4.3.1	Histologische Analyse.....	79
4.3.2	Genexpressionsanalyse .....	86
4.3.3	Biochemische Analyse.....	89
4.3.4	Protein- Analyse .....	91
5	Diskussion.....	94
5.1	In-vitro-Differenzierung von hMSC's unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen .....	94
5.2	Einfluss des RA-Signalweges auf die Differenzierung von hMSC's .....	97
5.2.1	BMS493- und RA-Effekte unter chondrogenen Bedingungen .....	97
5.2.2	BMS493- und RA- Effekte unter hypertrophen Bedingungen .....	100
5.2.3	Zusammenfassung .....	107
6	Anhang.....	110
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	110
6.2	Tabellenverzeichnis.....	113
7	Literaturverzeichnis .....	114
8	Danksagung	

# 1 Einleitung

## 1.1 Hyaliner Knorpel

Knorpel wird, abhängig von der Matrixzusammensetzung sowie der Menge und Größe der Chondrone, unterteilt in elastischen Knorpel, Faserknorpel und hyalinen Knorpel (Bhosale und Richardson 2008).

Faserknorpel finden sich in Bandscheiben, in der Symphyse, in den Menisken, als Gelenkknorpel im Kiefergelenk, sowie an den Übergängen von Sehnen und Bändern am Knochen. Im Gegensatz zum elastischen und hyalinen Knorpel ähnelt Faserknorpel aufgrund seines Reichtums an Kollagen Typ I straffem Bindegewebe und ist somit besonders zugfest und gegen Scherkräfte widerstandsfähig. Zudem besitzt Faserknorpel kein Perichondrium, die Chondrone sind deutlich kleiner und auch in einer geringeren Menge vertreten. Der Aufbau des elastischen Knorpels ähnelt dem des hyalinen Knorpels, jedoch lassen sich zusätzlich neben maskierten Kollagenfasern auch reichlich elastische Fasern finden, weswegen er gelblich erscheint. Aufgrund der hohen Druck- und Biegestabilität kommt elastischer Knorpel typischerweise in der Ohrmuschel, in der Ohrtrumpete und im äußeren Gehörgang vor. Als häufigster Knorpeltyp befindet sich hyaliner Knorpel im Rippenknorpel, im knorpeligen Gerüst der Nase, des Kehlkopfes und der Bronchien, an den artikulierenden Oberflächen im Synovialspalt (hier besitzt er jedoch kein Perichondrium) und als Knochenvorstufe im Rahmen der endochondralen Ossifikation. Hyaliner Knorpel ermöglicht ein reibungsloses Gleiten der Gelenkoberflächen, ist ausgesprochen druckkompressibel und stoßdämpfend (Ulfig 2015).

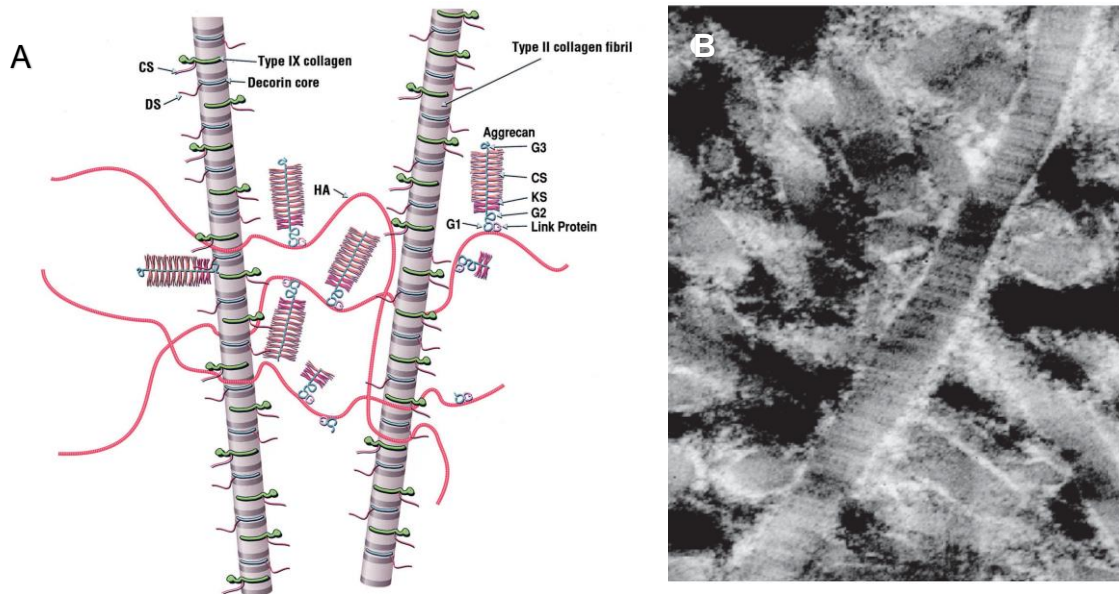
### 1.1.1 Aufbau und Struktur des hyalinen Knorpels

Gelenkknorpel ist ein hochentwickeltes Gewebe, welches sich im Laufe der Evolution immer weiter optimiert hat. Eine besondere Herausforderung ist die Tatsache, dass es sich beim Knorpel um bradytrophes Gewebe handelt, also frei von Gefäßen und Nerven. Bradytrophes Gewebe zeichnet sich aufgrund der Mindervaskularisation durch einen langsamen Stoffwechsel und verzögerte Umbauprozesse aus, da die Ernährung des Knorpels durch Diffusion erfolgen muss. Adulter Gelenkknorpel zeichnet sich vornehmlich als azelluläres Gewebe mit einem ungefähren Zellvolumen von 2% des Gesamtvolumens aus. Der Rest besteht aus umfangreicher Extrazellulärmatrix, die von den Chondrozyten synthetisiert wird (Stockwell 1978). Chondrozyten stellen den einzigen Zelltyp im gesunden Knorpelgewebe dar und entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen. Ähnlich wie bei der endochondralen Ossifikation durchlaufen sie eine Differenzierungsphase, werden GDF5 exprimierende Zellen der Interzone, aus denen dann ein phäno- und genotypisch stabiler Knorpel entsteht (Shwartz et al. 2016). Sie arretieren somit vor der terminalen Phase, der Hypertrophie und Kalzifizierung. Die EZM (Extrazellulärmatrix) besteht hauptsächlich aus Proteoglykanen, Kollagen und Wasser, welches 60-80% des Nassgewichts ausmacht. Es dient der Nährstoffversorgung, ermöglicht eine druckabhängige Deformierung des Knorpels und ein reibungsarmes Gleiten der Gelenkoberflächen. Weitere 10-20% des Nassgewichts bilden Kollagenfibrillen, von denen wiederum, mit einem Anteil von 90%, Kollagen Typ II die Hauptkomponente ausmacht. Es bildet zusammen mit Kollagen Typ IX und XI Heterofibrillen. Diese wiederum werden intermolekular und intramolekular an Lysinresten durch Cross-Link-Verbindungen verknüpft, sodass ein Netzwerk aus Kollagenfibrillen entsteht (Poole et al. 2001; Gelse et al. 2003). Kollagen I befindet sich nur in geringem Maße in der obersten Zone und Kollagen X in der hypertrophen Zone am Übergang zum Knochen (Mollenhauer 2008; Mandler et al. 1989). 10% des Nassgewichts bilden Proteoglykane: kleinere Proteoglykane wie Decorin, Biglycan und Fibromodulin, sowie das in Relation große Proteoglykan Aggrecan, welches über Linkproteine mit dem glukonierten Säurepolymer Hyaluron



verbunden ist. Aggrecan besteht aus sulfatierten Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAGs) aus Chondroitin- und Keratansulfat, welche über Zuckerbindungen an ein Kernprotein gekoppelt sind. Bedingt durch die restriktive Ausbreitung des Kollagenfibrillen-Netzwerks sind die Proteoglykane lediglich bis zu 40-60% hydriert. Dadurch bildet sich der für die Härte des Knorpels entscheidende Schwellendruck. Eine Destruktion des Kollagen-Netzwerks führt dementsprechend zu einer Zunahme der Schwellung und Enthärtung des Knorpels, ein Phänomen, welches in der Frühphase der Osteoarthritis (Arthrose) zu erkennen ist (Bhosale und Richardson 2008).

Hyaluron bindet zusätzlich an die Chondrozyten via dem CD44 Zelloberflächenrezeptor. Diese strukturelle Verbindung spielt eine wichtige Rolle in der Zell-Matrix-Interaktion (Chow et al. 1998). Weitere 5% des Nassgewichts machen Glykoproteine aus. Obwohl einige Funktionen wie Zelladhäsion (Fibronectin), Bindung von Calcium (Chondrocalcin) und wachstumsfördernde Eigenschaften (BMP) bekannt sind, bleiben die Glykoproteine die am wenigsten verstandene Einheit des Gelenkknorpels (Mollenhauer 2008). Als weitere kleine Moleküle enthält Knorpel Kalium (Gegenion für die negativ geladenen Proteoglykane), Calcium (insbesondere in der mineralisierten Schicht) sowie freie Fette (welche im Alter zunehmen) (Prydz und Dalen 2000).



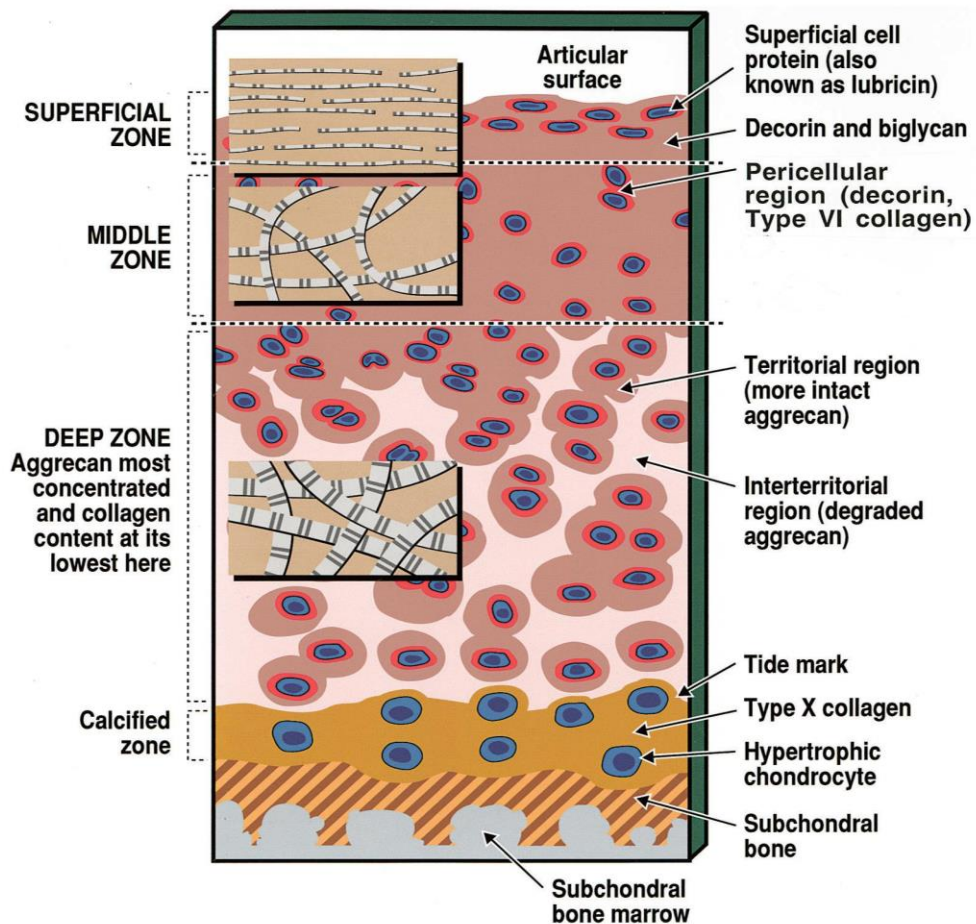
**Abbildung 1:** **A** Darstellung des Kollagennetzwerk und Aggrecan mit Hyaluronsäure (Poole *et al.* 2001) **B** Kollagen Typ II Faser im Gelenkknorpel (Gelse *et al.* 2003)

Die Anordnung und die Organisation des Knorpels stehen im engen Zusammenhang mit der jeweiligen Funktion. An der freien Oberfläche, welche direkt von Synovialflüssigkeit umgeben wird, sind Zellen und Matrix anders angeordnet als im restlichen Gewebe. In dieser sogenannten „Superfiziellen Zone“ sind die Chondrozyten abgeflacht, ellipsoid und parallel zur Oberfläche ausgerichtet. Lediglich hier synthetisieren die Chondrozyten auch das sogenannte "Superficial zone protein", ein Molekül, auch bekannt als "Lubricin" oder "Megakaryozyten stimulierender Faktor". Es wird auch von den Synovialzellen produziert (Decker 2017). Seine wichtige Rolle für eine reibungslose Artikulation zeigt sich unter anderem darin, dass es bei einem Gendefekt desselben zum Campodactylie-Arthropathie-Coxa Vara-Pericarditis Syndrom kommt: eine frühreife Destruktion von großen Gelenken mit therapieresistenten Gelenkergüssen, Coxa vara und nichtinflammatorischer Perikarditis (Ai *et al.* 2015).

Die Matrix der superfiziellen Zone ist dominiert vom Fibrillennetzwerk, Aggrecan ist hier am schwächsten vertreten. Durch den Faserreichtum und die parallele Anordnung ermöglicht die superfizielle Schicht die höchste Zugfestigkeit im gesamten Gelenkknorpel und leitet in erster Linie horizontale Scherkräfte ab.

Unterhalb der superfiziellen Zone befindet sich die Transitionszone. Insgesamt nimmt die Zelldichte hier ab, während gleichzeitig die EZM zunimmt. Die Chondrozyten nehmen eine spheroidale Form an und die im Durchmesser größeren Kollagenfibrillen sind unregelmäßig in der Matrix verteilt. Zwischen dieser Zone und einer Schicht aus kalzifiziertem Knorpel befindet sich die tiefe Zone bzw. Radiärzone. Die Zelldichte sowie der Kollagengehalt sind hier am geringsten, während Aggrecan-Konzentration und Fibrillen-Durchmesser ihr Maximum erreichen. Die Grenze zwischen der tiefen Zone und der kalzifizierten Knorpelschicht bildet die „Tide mark“ (Sophia Fox et al. 2009). Die genaue Funktion und die exakte molekulare Zusammensetzung bleiben nach wie vor unklar. Lange Zeit als inaktive und nutzlose Struktur angesehen, sind Chondrozyten, wie neuere Studien gezeigt haben, in dieser Schicht fähig, Sulfate in die perizelluläre und territoriale Matrix einzubauen. Diese metabolische Aktivität ist wichtig für den Umsatz im gesunden Knorpel (Bhosale und Richardson 2008). Eine neuere Studie kommt zu dem Ergebnis, dass im Zuge der Apoptose aufgrund der mechanischen Belastung Zelltrümmer zu der unteren Knorpelschicht gebracht werden. Dieses resultierende Depot der apoptotischen Zellkörper bildet dann die "Tidemark". Bei Osteoarthritis nimmt die Apoptose deutlich zu und die normalerweise einfach dünne "Tidemark" verdoppelt sich zu zwei Lagen (Simkin 2008; Simkin 2012).

In der kalzifizierten Zone exprimieren die Chondrozyten, wie während der endochondralen Ossifikation, Kollagen X und es erfolgt ein Kalzifizieren der Matrix. Im Gegensatz zum Knochen wird die kalzifizierte Matrix nicht vollständig resorbiert und lässt kein Eindringen von Blutgefäßen zu. Sie dient insbesondere zur Verankerung der Kollagenfibrillen der tiefen Zone an den subchondralen Knochen.



**Abbildung 2:** Darstellung der verschiedenen Zonen in einem erwachsenen Gelenkknorpel. Die eingefügten Bildausschnitte zeigen Durchmesser und Anordnung der Kollagenfibrillen in den jeweiligen Zonen (Poole et al. 2001, S28).

### 1.1.2 Knorpelschäden und Reparaturkapazitäten

Das Fehlen von Gefäßen, Lymphbahnen und Nerven macht hyalinen Knorpel zu einem einzigartigen Gewebe und stellt gleichzeitig eine große Herausforderung bei Verletzungen und den anschließenden Therapieoptionen dar (Kim et al. 1991; Mackay et al. 1998). „Laut einer Erhebung der WHO im Jahr 2000 befanden sich Erkrankungen des Bewegungsapparats beim Verlust an gesunder Lebenszeit an dritter Stelle nach koronaren Herzerkrankungen und zerebrovaskulären Erkrankungen und noch vor den Neoplasien! Neben der Reduktion der Lebensqualität durch zunehmende funktionelle Beeinträchtigung und Schmerzen ergibt sich aus Knorpelschäden und ihrer

Behandlung ein erhebliches sozioökonomisches Problem. So müssen in der BRD von den Kostenträgern jährlich ca. 15 Milliarden Euro für Behandlung und die Folgen degenerativer Gelenkerkrankungen aufgebracht werden. Dies entspricht ungefähr 7% der Gesamtkosten im deutschen Gesundheitswesen“ (Schewe et al. 2008, S. 77).

Geschädigte Gelenkknorpel besitzen lediglich eine limitierte Heilungskapazität, sowohl für partielle als auch für Vollknorpelschäden. Neben der Avaskularität trägt hierzu auch das Fehlen einer undifferenzierten Zellpopulation bei, welche auf eventuelle Verletzungen adäquat durch Proliferation und Regeneration reagieren könnte (Mankin 1982; Minas 2012). Durch kontinuierliche mechanische Belastung über Jahre hinweg, aber auch durch akute Traumata, kommt es zur Abnutzung oder zum Verlust des Gelenkknorpels, bis hin zum klinischen Bild einer Arthrose, charakterisiert durch Schmerz, Funktions- und Bewegungsverlust und Gelenkdeformierung (Banaszkiewicz 2014; Arokoski et al. 2000; Breinan et al. 2001). Bereits vor mikroskopisch sichtbaren Veränderungen kommt es auf biochemischer Ebene zu Veränderungen: Abnahme an Proteoglykanen, kurzfristige Zunahme des Wassergehalts und Desorganisation und Schädigung des Kollagennetzwerkes durch Matrixmetalloproteinasen wie Kollagenasen und Stromelysin. Wenn Chondrozyten den Schaden detektieren, kommt es als Reaktion zur Ausschüttung von Mediatoren, vermehrter Expression von Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Ausschüttung von NO, einer gesteigerten anabolischen und katabolischen Aktivität, sowie zur Proliferation der Chondrozyten mit Zunahme des PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) (Dozin et al. 2002; Martin und Buckwalter 2001). Das Verfehlen einer Balanceherstellung führt jedoch letztlich zu einer Abnahme der Chondrozyten mit Zunahme des FAS-Liganden (FS7-associated cell surface antigen), ein zur TNF-Superfamilie der Zytokine gehörendes Typ II Transmembran-Glykoprotein, als Ausdruck einer gesteigerten Apoptose (Rieux-Laucat et al. 2018). Mikroskopisch lassen sich zudem Destruktionen erkennen, wie eine Verdickung der „Tidemark“, Einrisse an der Oberfläche mit Abfaserungen, eine Knorpelglatze als Endstadium des Knorpelabriebs bis hin zu tiefergehenden Verletzungen mit Knochenbeteiligung. Isolierte und kleine Knorpelschäden, meist unentdeckt im Röntgen, bleiben bei jungen, sportlichen Patienten oft asymptomatisch,

können jedoch in den darauffolgenden Jahren eine Arthrose nach sich ziehen (Pullig et al. 2001; Schewe et al. 2008; Messner und Maletius 1996). Insgesamt beeinflusst die Defektgröße jedoch maßgeblich die Entwicklung einer Arthrose; dabei gilt: je größer der Defekt, desto größer die Wahrscheinlichkeit einer Arthrose (Aglietti et al. 2001; Simonian et al. 1998).

### **1.1.3 Aktuelle Behandlungsoptionen bei Knorpeldefekten**

Je nach Ausmaß der Defektgröße und -tiefe sowie weiteren Faktoren wie Patientenalter, Grad an Gelenkvorschädigung bzw. Ausmaß von Begleitverletzungen, stehen dem behandelnden Arzt verschiedene Therapieansätze zur Auswahl. Eine konservative Therapie im Sinne einer physikalischen Therapie, Kühlung und Schmerzmedikamente macht nur bei Jugendlichen vor dem Schließen der Wachstumsfuge Sinn, da hier der Knorpel noch Anschluss an die Wachstumsfuge besitzt und somit an eine noch undifferenzierte, hochproliferative Zellpopulation. Kortikosteroide werden nicht empfohlen (Schewe et al. 2008; Jubel et al. 2002).

Eine Operation dient nicht nur der Schmerzlinderung und Wiederbelastung, sondern vor allem der Rekonstruktion eines intakten Gelenkknorpels, um Folgeschäden wie einer Gelenkarthrose erfolgreich entgegenzuwirken. Dafür stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung:

*Refixation:* Beim frischen Ausbruch eines größeren Flakes kann zeitnah die Refixation mit biologisch abbaubaren Pin-Systemen erfolgen. Dieses Verfahren ist jedoch nur erfolgversprechend bei Fragmenten mit einer ausreichend großen knöchernen Fläche und dem Fehlen von Kontusionsspuren und sollte nicht bei rein chondralen Flakes verwendet werden (Schewe et al. 2008; Chung et al. 2015; Forkel et al. 2017).

*Knochenmarkstimulation:* Mittels Arthroskopie wird der subchondrale Knochen angebohrt (Pridie K. H., Zk, H., & Gordon-Strachan, G. 1959) oder durch Mikrofrakturierung (Steadman et al. 1999) eröffnet. Dadurch können mesenchymale

Stammzellen aus dem Knochenmark mit einem „super-clot“ einen Defekt von bis zu 2 cm<sup>2</sup> Größe auffüllen. Beste Evidenz zeigt hierbei die Mikrofrakturierung mit einer Ahle, erstmals von Steadman beschrieben, die, im Gegensatz zur Pridie-Bohrung, keine Hitzenekrose verursacht und im Vergleich zur Abrasions-Arthroplastie längerfristige Erfolge verzeichnen kann (Jubel et al. 2002; Bert und Maschka 1989; Steadman et al. 1999; Steadman et al. 2001; Müller und Kohn 1999; Stone et al. 1992). Jedoch konnten auch Studien zeigen, dass es durch die Ahle zu einer Kompression der Spongiosa kommt und dadurch der Ausfluss von Stammzellen aus dem Knochenmark verhindert wird (Madry et al. 2014). Zudem spielt der Durchmesser der gesetzten Bohrlöcher eine entscheidende Rolle (Eldracher et al. 2014). Den einwandernden Zellen misslingt es jedoch, die exakte Zusammensetzung und mechanischen Eigenschaften hyalinen Knorpels zu reproduzieren, so dass sich lediglich ein faserknorpeliges Bindegewebe ausbildet, welches dem hyalinen Knorpel hinsichtlich mechanischer Belastbarkeit und Haltbarkeit nachsteht (Buckwalter und Lohmander 1994; Mithoefer et al. 2005).

*Osteochondrale Transplantation (Mosaikplastik):* Die Osteochondrale Transplantation eignet sich besonders gut für Defekte mittlerer Größe, das heißt bis zu 4 cm<sup>2</sup>. Hierbei werden osteochondrale Zylinder aus weniger belasteten Zonen, meist der intercondylaren Region, entnommen und mittels Presspassung in den zuvor präparierten Defekt eingesetzt (Bobić 1996). Somit gelingt eine langfristig haltbare Auffüllung des Defektes mit hyalinem Knorpel. Dieses Verfahren ist jedoch wegen zunehmender Donormorbidität bei der Entnahme mehrerer Zylinder und begrenzter Verfügbarkeit der Donorzylinder limitiert und wird folglich kontrovers diskutiert (Angele et al. 2005; Chow et al. 2004).

*Autologe Chondrozytentransplantation (ACT):* Diese Methode wird bei Knorpeldefekten über 4 cm<sup>2</sup> Größe eingesetzt und besteht aus zwei operativen Eingriffen.

In einem ersten Eingriff werden mittels Arthroskopie zwei bis drei kleine osteochondrale Zylinder aus einer wenig belasteten Gelenkregion entnommen. Die Chondrozyten werden isoliert und für zwei bis drei Wochen in Monolayerkulturen

kultiviert, ehe die Zellsuspension in einer zweiten OP in den Defekt eingebracht wird. Zu Abdeckung des Defekts und der Zellsuspension stehen dabei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Bei der konventionellen ACT („Brittberg-Technik“) wird als Abdeckung ein Periostlappen verwendet, welcher zuvor aus der Tibia präpariert wurde. Problematisch hierbei sind jedoch die Entstehung einer Hypertrophie und/oder einer Kalzifizierung des Periostallappens, was oft nach Jahren zu einer Korrekturoperation zwingt (Brittberg 2008).

Deswegen wird heutzutage die Matrix gestützte ACT (MACT) favorisiert. Hierbei werden Chondrozyten auf einer Membran aus porcinem Kollagen I/III ausgesät und diese mittels Fibrinkleber direkt auf den Defekt aufgetragen (Bartlett et al. 2005) oder in den Defekt passgenau eingenäht. Eine Kombination aus Mikrofrakturierung und Abdeckung mittels einer Membran aus Kollagen I/III wurde erstmals von Behrens (2006) als „Autologe Matrix-induzierte Chondrogenese (AMIC)“ vorgestellt.

Besonders geeignet ist dieses Verfahren für Totalknorpelschäden bis zu einem Durchmesser von 1,5 cm<sup>2</sup> (Benthien und Behrens 2010; Behrens et al. 2006). Mittels MACT und AMIC gelingt es, ein Knorpelregenerat zu bilden, welches dem hyalinen Knorpel in seinem Aufbau am nächsten kommt und somit in vielen Studien, insbesondere im längerfristigen Outcome, den anderen Methoden überlegen ist (Schewe et al. 2008; Brittberg 2008; Buckwalter und Mankin 1998).

Trotz dieser vielversprechenden Fortschritte in der Knorpelreparatur besteht nach wie vor die Herausforderung, dem Patienten mittels Regeneration eines hochwertigen hyalinen Gelenkknorpels eine vollständige und lebenslange Beschwerdefreiheit zu gewährleisten. Ausgereifte Chondrozyten, wie sie bei der „Autologen Transplantation“ verwendet werden, besitzen nur eine geringe Proliferationsfähigkeit, und bei Expansion in einer Monolayerkultur kommt es zur Abnahme gelenkknorpelspezifischer Gene wie Kollagen II, Aggrecan und des Transkriptionsfaktors SOX9 (Hardingham et al. 2002). Somit ist der Nutzen für eine in-vivo-Rekonstruktion des Knorpelgewebes limitiert. Auch aufgrund der Entnahmemorbidität ist in den letzten zwei Jahrzehnten der Begriff des „Cartilage Tissue Engineering“ immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Tissue

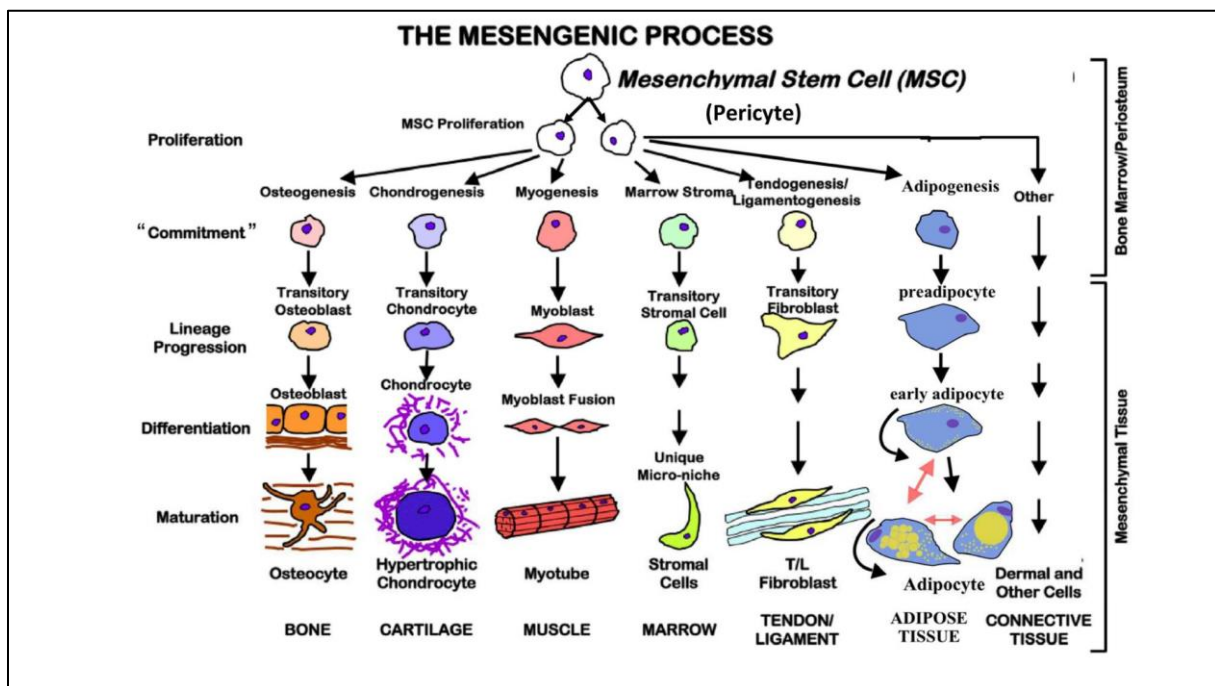


Engineering beschäftigt sich mit der Herstellung und Reparatur von Geweben in vitro durch den Gebrauch von körpereigenen Substanzen und Signalwegen. Als geeignete Zellen haben sich insbesondere die 1970 erstmals von Friedenstein und Kollegen identifizierte mesenchymale Stammzellen herauskristallisiert (Friedenstein et al. 1970). Mesenchymale Stammzellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und der einfachen Gewinnung interessante und vielversprechende Zellkandidaten. Über dies sind sie, im Gegensatz zum Einsatz von embryonalen Stammzellen, ethisch akzeptiert (Hardouin et al. 2000; Reddi 1994).

## 1.2 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind undifferenzierte, nicht-hämatopoetische Progenitorzellen, fähig zur Differenzierung in verschiedene mesenchymale Zelllinien wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Bruder et al. 1998; Chen et al. 2006; Lange et al. 2005). Zusätzlich besitzen sie durch die asymmetrische Teilung, mit der Entstehung einer identischen Tochterzelle, ein hohes Selbsterneuerungspotential (Lin 1997; Tuan et al. 2003; Augello et al. 2010). Das Proliferations- und Differenzierungspotential hängt dabei entscheidend vom Patientenalter, Vorerkrankungen und Isolierungsgewebe ab (Dimarino et al. 2013). MSCs kommen in großer Menge in unterschiedlichen erwachsenen Geweben wie Muskel, Knochen trabekel, Gelenkknorpel, Fett und Knochenmark vor (Pelttari et al. 2008). So weist zwar Fettgewebe die größte Häufigkeit an MSCs auf, jedoch besitzen MSCs aus Synovialgewebe die höchste chondrogene Differenzierungskapazität, gefolgt von MSCs aus dem Knochenmark (Kern et al. 2006). Der jeweilige Differenzierungsweg in die unterschiedlichen Zelllinien ist abhängig von der Mikroumgebung, der Präsenz verschiedener gewebsspezifischer Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sowie physikalischer Begebenheiten (Chen et al. 2006; Heng et al. 2004). Intensive Forschungen ergeben immer weitere neue Charaktereigenschaften. So zeigte sich, dass MSCs auch immunsuppressive und anti-inflammatorische Effekte besitzen und ihr klinischen Einsatz somit für Arthrose-

Patienten höchst interessant ist (Chen und Tuan 2008; Le Blanc und Ringdén 2007; Uccelli et al. 2007). Zudem sind pluripotente Stammzellen auch zur erneuten Transdifferenzierung in einen anderen Zelltyp fähig und nicht, wie bisher angenommen, streng auf eine Zelllinien-Hierarchie beschränkt (Tuan et al. 2003; Kopen et al. 1999; Azizi et al. 1998). Dennoch bleiben viele Fragen und Charakterisierungseigenschaften wie zum Beispiel die Etablierung eines spezifischen Oberflächenmarkers noch ungeklärt (Kolf et al. 2007; Peltari et al. 2008).



**Abbildung 3:** Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen in verschiedene Zelllinien (Dimarino et al. 2013) .

### 1.2.1 Chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Tissue Engineering besteht im Wesentlichen aus drei Säulen: erstens geeignete Zellen, zweitens passende biologische Faktoren als Stimulus und drittens eine Trägersubstanz, welche die Matrixbildung optimal unterstützen sollte (Kuo et al. 2006).

Das chondrogene Differenzierungspotential der MSCs und somit ihre Tauglichkeit zum Tissue Engineering wurde bereits vor Jahrzehnten erforscht und beschrieben (Ashton et al. 1980; Owen 1978; Johnstone et al. 1998). Die chemische Zusammensetzung der biokompatiblen Trägersubstanzen sollte möglichst der des Ursprungsgewebes nahekommen. Somit existieren heute neben matrixfreien Aggregatkulturen auch Kultursysteme, basierend auf Kollagen, Hyaluronan, Chondroitin-Sulfat, mineralisiertem Kalzium, Fibrin oder anderen Bestandteilen der EZM. Aber auch nicht-knorpel-spezifische Materialien wie Gelatine und Alginat, oder komplett synthetische wie Polylactid-co-Glycolid (Polyester aus Milchsäure und Glycolsäure) oder Polyethylenglykol befinden sich heute im Einsatz (Heng et al. 2004; Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998; Ichinose et al. 2005a; Diekman et al. 2010; Chen et al. 2005; Sekiya et al. 2002). 1998 wurde erstmals das klassische in vitro-Chondrogenese System von Johnstone an Kaninchenstammzellen vorgestellt und später von Yoo auf humane mesenchymale Stammzellen übertragen (Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998). Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche in vitro-Knorpelbildung war ein definiertes serumfreies Differenzierungsmedium, welches TGF- $\beta$ , Dexamethason, Ascorbat, Pyruvat, Prolin und IST enthielt (Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998; Pittenger et al. 1999; Barry et al. 2001; Mwale et al. 2006). Als entscheidender Faktor stellte sich auch der dreidimensionale Charakter des Systems heraus, der durch Zentrifugieren der Zellen zu Pellets erreicht wurde. Dieser Schritt scheint die Kondensation, die sich zu Beginn der Skelotogenese unter dem Einfluss von N-Cadherin und N-CAM ereignet, zu imitieren (Hall und Miyake 2000). In einem Experiment ohne Pelletbildung gelang es den Zellen nicht, sich vollständig zu Knorpelgewebe zu differenzieren, was auf die Notwendigkeit eines engen Zell-Zell-Kontakts und einer hohen Zelldichte hindeutet (Ichinose et al. 2005a). Unter diesen definierten Bedingungen gelingt es den MSCs, ein hyalines, knorpelartiges Gewebe zu bilden, welches reich an Kollagen Typ II, Kollagen Typ IX, Kollagen Typ XI, Aggrecan, COMP („Cartilage oligomeric protein“) und weiteren chondrogenen Markern ist (Sekiya et al. 2002; Augello et al. 2010; Barry et al. 2001; Chen et al. 2005; Diekman et al. 2010; Johnstone et al. 1998).

Die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ist ein streng regulierter Vorgang, der Interaktionen von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Signalmolekülen aufweist. Eine große Anzahl an relevanten Signalmolekülen wie „Bone morphogenetic proteins“ (BMPs), „Transforming growth factors“ (TGF- $\beta$ ), Transkriptionsfaktoren wie Sox9 und Runx2, „Parathyroid hormone-related peptide“ (PTHrP), „Fibroblast growth factors“ (FGFs), „Insulin like growth factor-1“ (IGF-1), die an der Regulierung der chondrogenen Differenzierung von MSCs zu hypertrophen Chondrozyten beteiligt sind, ist mittlerweile bekannt (Li und Dong 2016). Dabei sind TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 die effektivsten und am meisten untersuchten Induktoren der chondrogenen Differenzierung, ohne deren Präsenz es zur keiner Ausbildung eines hyalinen, knorpel-artigen Gewebes kommt (Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998; Boeuf und Richter 2010).

Unzureichend geklärt ist hierbei jedoch, welcher der drei Isoformen das stärkste chondrogene Potential zugerechnet werden kann; während in einigen Studien die chondrogene Knorpel-expression insbesondere für TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 am höchsten war, wurde in anderen Studien kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Isoformen gefunden (Barry et al. 2001; Freyria und Mallein-Gerin 2012; Mueller et al. 2010). Weitere Wachstumsfaktoren wie IGF-1, BMPs und FGFs scheinen die Chondrogenese nur zu fördern, wenn sie in Kombination mit TGF- $\beta$  gegeben werden, während in alleiniger Applikation keine Induktion der Chondrogenese erfolgte (Indrawattana et al. 2004; Ichinose et al. 2005a; Winter et al. 2003; Boeuf und Richter 2010). Darüber hinaus scheinen auch Umweltfaktoren wie mechanische Stimulation und Hypoxie die Chondrogenese von MSCs in vitro zu modulieren (Potier et al. 2010; Boeuf und Richter 2010; Li und Dong 2016).

### **1.2.2 Hypertrophie der chondrogen differenzierten Stammzellen**

Trotz der erfolgreichen Bildung von hyalinen, knorpel-spezifischen Markern wie Kollagen II und Aggrecan kommt es bei der in vitro-Chondrogenese ebenfalls zum Auftreten von Faserknorpel-spezifischem Kollagen I, zur Expression von Hypertrophie-assoziierten Genen wie Kollagen X, MMP13, VEGF, PTHrP-R und zu

erhöhter alkalischer Phosphatase-Aktivität (Johnstone et al. 1998; Yoo et al. 1998; Mwale et al. 2006; Mueller et al. 2013; Lian et al. 1993; Studer et al. 2012; Ichinose et al. 2005b). In einigen Studien wurde dabei der Anstieg von Kollagen X noch vor dem Auftauchen von Kollagen II festgestellt, weswegen die Verwendung als Hypertrophie-Marker umstritten ist (Mwale et al. 2006).

Das Phänomen der Hypertrophie und der damit assoziierten Gene ist bisher vorrangig im Zuge der endochondralen Ossifikation bei der Skelettbildung oder im Rahmen der Knochenreparatur bekannt. Versuche, chondrogen vordifferenzierte MSCs-Pellets subkutan in SCID Mäusen zu implantieren, führten zum starken Kalzifizieren des Knorpels, kleinen Verknöcherungen und vaskulärer Invasion. Die Implantation artikulärer Chondrozyten führte dagegen zur Bildung eines ektopen stabilen Knorpels, positiv anfärbbar für Kollagen II und ohne Nachweis von Kollagen Typ I und X (Pelttari et al. 2006; Dell'Accio et al. 2001). Insgesamt lassen diese Beobachtungen vermuten, dass unter bisherigen in vitro-Kulturbedingungen Chondrozyten, differenziert aus MSCs, nicht einen permanent stabilen Phänotyp bilden wie artikuläre Chondrozyten, sondern ein ähnliches Differenzierungsprogramm durchlaufen wie in der endochondralen Ossifikation während der embryonalen Skelettentwicklung (Mueller und Tuan 2008). Zum besseren Verständnis der Vorgänge und regulatorischen Mechanismen der Hypertrophie in MSCs wurde ein in vitro-Hypertrophie-Modell für mesenchymale Stammzellen etabliert, in dem die Ähnlichkeit ihrer Differenzierungsschritte mit denen der Chondrozyten der Wachstumsfuge während der endochondralen Ossifikation hinsichtlich Genexpression und Zellmorphologie gezeigt wurde. Nach 14 Tagen chondrogener Differenzierung konnte durch das Weglassen von TGF- $\beta$ , Reduktion von Dexamethason und Zugabe des Schilddrüsenhormons T3 Hypertrophie erfolgreich induziert werden. Es zeigte sich, dass unter diesen prohypertrophen Bedingungen es nicht nur zur Größenzunahme der Zellen kam, sondern dass auch hypertrophie-spezifische Gene wie Kollagen X, MMP13, Osteocalcin, Ihh und ALP-Aktivität hochreguliert wurden, ohne dass dabei die Zugabe von  $\beta$ -Glycerophosphate notwendig war (Mueller und Tuan 2008; Mackay et al. 1998; Steinert et al. 2009). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass neben dem Schilddrüsenhormon T3 auch BMPs,

vornehmlich BMP-2 und BMP-4, nicht nur die chondrogene Differenzierung verstärken, sondern auch mit der Hypertrophie-Induktion und der höheren Expression von Kollagen X, MMP13 und Ihh assoziiert sind (Steinert et al. 2009; Kolf et al. 2007; Trippel et al. 2007; Pfeifer et al. 2016; Karl et al. 2014).

### **1.3 Endochondrale Ossifikation**

Im Gegensatz zur intramembranösen Ossifikation, in welcher sich mesenchymale Stammzellen nach dem Kondensationsschritt direkt zu Osteoblasten umwandeln und Knochenmatrix formen, bildet sich im Rahmen der endochondralen Ossifikation zunächst eine Knorpelanlage, welche das Skelettgrundgerüst bildet und schrittweise durch Knochen ersetzt wird. Während intramembranöse Ossifikation bei der embryonalen Bildung vom platten Schädelknochen sowie von Mandibula und Klavikula stattfindet, werden nicht nur die meisten Knochen während der Skeletogenese, sondern auch neue Knochen im Rahmen der Frakturheilung durch die endochondrale Ossifikation gebildet (Gawlitta et al. 2010; Kronenberg 2003; Yamagiwa und Endo 2009). Zunächst kondensieren mesenchymale Stammzellen und exprimieren dabei neben extrazellulärer Matrix auch Zelladhäsionsmoleküle wie N-Cadherin, N-CAM, Tenascin C, Versican und Thrombospondin-4. Im Zentrum der Diaphyse des zukünftigen Röhrenknochens entwickelt sich das primäre Ossifikationszentrum, später bilden sich in der Peripherie sekundäre Ossifikationszentren. Zwischen diesen ossifizierten Arealen entwickelt sich zentral die Epiphysenfuge, innerhalb derer sich charakteristische Zonen hinsichtlich Morphologie und Matrixproduktion unterscheiden lassen. Lediglich Zellen am Rande bleiben undifferenziert und bilden das Perichondrium (Lefebvre und Smits 2005). Zellen in der Reservezone, die am weitesten vom Ossifikationszentrum entfernt ist, stellen ein ruhendes Vorläuferreservoir für Chondrozyten dar. In der darauffolgenden proliferierenden Zone entwickeln sich die Prä-Chondrozyten zu reifen Chondrozyten, beginnen sich zu teilen und synthetisieren eine Matrix, reich an Kollagen II, Kollagen IX, Kollagen XI und Aggrecan. Anfangs klein und rund, nehmen sie nun eine abgeflachte Form an und ordnen sich zu Säulen an. Von großer Bedeutung für die

Induktion und Aufrechterhaltung dieser Phase sind die Transkriptionsfaktoren Sox9, sowie L-Sox5 und Sox6 (Ikeda et al. 2004). Ebenso verzögern der Parathormon- verwandte Protein-Rezeptor und das Indian Hedgehog Protein (Ihh) in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten die hypertrophe Reifung und fördern die Proliferation der Chondrozyten, was ein essentieller Faktor für das Längenwachstum ist. Dieses erfolgt zum einen durch Stimulierung der Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierung und damit Aktivierung von Sox9, zum anderen durch Inhibierung von Runx2. Werden Zellen aufgrund zunehmender Entfernung nicht mehr suffizient vom lokal sezernierten PTHrP stimuliert, stoppen sie die Proliferation, hypertrophieren und synthetisieren Ihh. Über eine Feedback-Schleife sendet Ihh wiederum ein Signal an die periartikulären Zellen, die Produktion von PTHrP zu fördern (Kronenberg 2005; Huang et al. 2001; Guo et al. 2006; Kronenberg 2003; Lee et al. 1996).

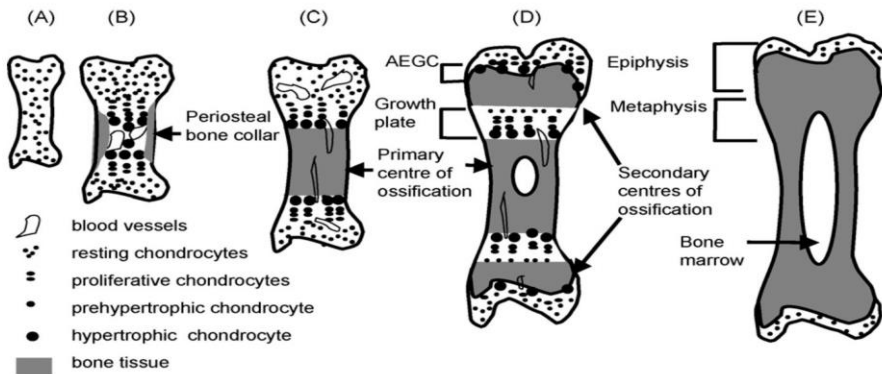
In der hypertrophen Zone kommt die Zellteilung zum Erliegen, die Zellen nehmen dramatisch an Volumen zu, es kommt zu einer Steigerung der ALP-Aktivität, vermehrter Expression von MMP13 und Angiogenesefaktoren (VEGF, Transferrin und „High mobility group box protein 1“), sowie zur verstärkten Synthese und Sekretion von Kollagen X. Notwendig hierfür sind die Transkriptionsfaktoren Runx2 und Runx3. Studien zeigten bei Runx2-negativen Mäusen das Fehlen von Osteoblasten, eine geringere Anzahl an hypertrophen Chondrozyten sowie fehlende Matrixmineralisierung, während die transgene Expression von Runx2 in wild-type-Mäusen die Hypertrophie beschleunigte, sogar in Knorpelgeweben, die normalerweise keine Hypertrophie Merkmale zeigen wie zum Beispiel Trachealringe (Takeda et al. 2001; Inada et al. 1999; Ueta et al. 2001).

Matrixvesikel mit Hydroxyapatit werden von den hypertrophen Chondrozyten in die umgebende EZM abgelagert und dienen als Ausgangspunkt der Mineralisierung (Mackie et al. 2008; Gawlitta et al. 2010; Ballock und O'Keefe 2003a; Gerber et al. 1999; Scotti et al. 2010). Die Mineralisierung der Matrixvesikel und der Knorpelmatrix ist dabei abhängig von der Alkalischen Phosphatase – Aktivität (Anderson et al. 2004).

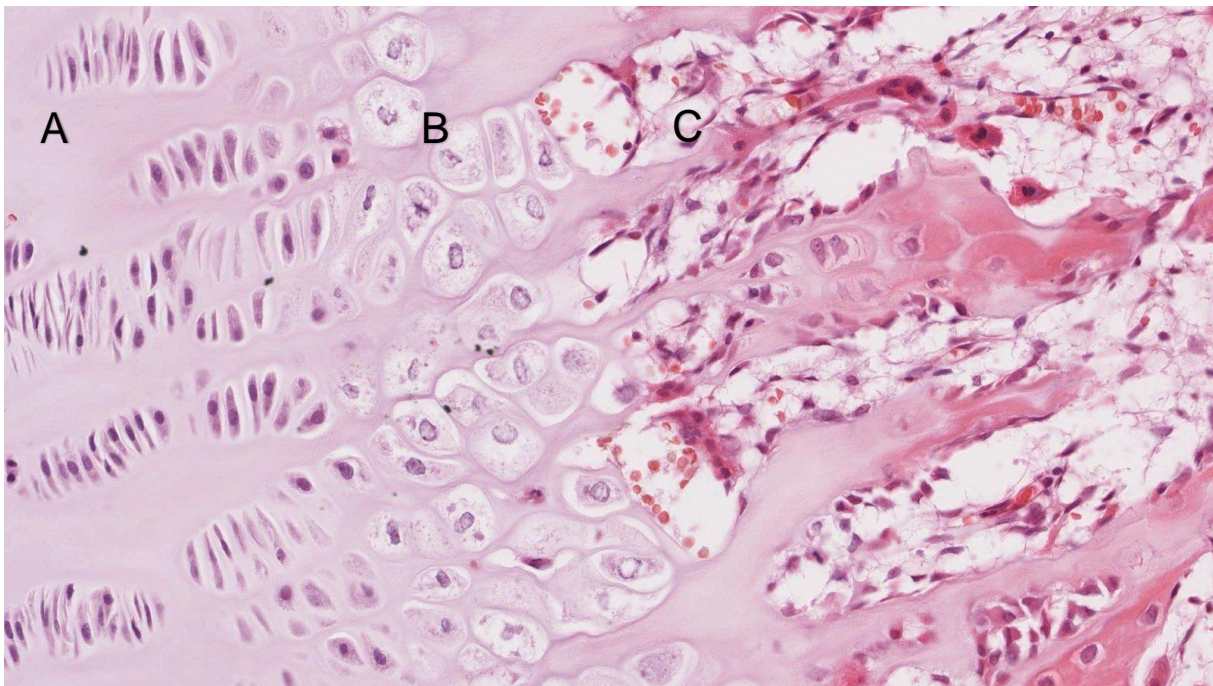
Hypertrophe Chondrozyten werden apoptotisch, die transversalen Säulen der Knorpelmatrix brechen durch den Matrixabbau zusammen und bilden vertikale Septen, welche die Einwanderung von Blutgefäßen, Osteoklasten und Osteoblasten-Vorläuferzellen ermöglichen, die daraufhin schrittweise das Knorpelgerüst durch Knochenmatrix ersetzen (Ballock und O'Keefe 2003b; Adams et al. 2007; Adams und Shapiro 2002). Der gesamte Ablauf der endochondralen Ossifikation unterliegt dabei der strengen Kontrolle von sowohl systemischen als auch lokal sezernierten Faktoren. So zeigten Kinder mit erhöhtem Konzentrationslevel des Wachstumshormons (GH) Gigantismus, wobei der Effekt durch das in der Leber gebildete IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) vermittelt wurde. Eine Reduktion der zirkulierenden IGF1-Konzentration führte bei Versuchen mit Mäusen folglich zu einem verringerten Längenwachstum (Yakar et al. 2002; Nilsson et al. 2005). Auch das Schilddrüsenhormon als systemischer Faktor ist an der Regulation beteiligt. Bei hypothyreotischer Stoffwechsellage ist das longitudinale Knochenwachstum verlangsamt, die Wachstumsfuge dünner und die chondrogene Hypertrophie behindert. In vitro hingegen konnte durch die Zugabe von T3 die Expression von Kollagen X, MMP13, so wie die Matrixmineralisierung gefördert werden (Adams et al. 2007; Mackie et al. 2008; Mueller et al. 2010).

Lediglich an der Gelenkoberfläche befinden sich die Zellen der Interzone, gekennzeichnet durch GDF5, welche nicht den Differenzierungsprozess durchlaufen und artikuläre Chondrozyten bilden, die typische Marker wie das Oberflächenprotein Lubricin exprimieren (Shwartz et al. 2016). Jedoch können sich auch diese normalerweise stabilen, artikulären Chondrozyten zu unreifen Chondroblasten zurückentwickeln oder aber die terminale hypertrophe Differenzierungsphase durchlaufen, wie es bei Osteoarthritis-Patienten beobachtet wurde. Das zeigt, dass im Normalfall der Differenzierungsstatus artikulärer Chondrozyten zwar permanent, aber keinesfalls terminal ist (Lefebvre und Smits 2005; Rhee et al. 2005).





**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Endochondralen Ossifikation des Knochens. (A) Knorpelanlage. (B) Bildung des primären Ossifikationszentrums im Zentrum mit chondrogener Hypertrophie und vaskulärer Invasion. (C) Primäres Ossifikationszentrum mit Knochenmatrix und Blutgefäßen. (D) Bildung der sekundären Ossifikationszentren und der dazwischenliegenden Wachstumsfuge, welche für das Längenwachstum des Röhrenknochens verantwortlich ist. (E) Erwachsener Knochen mit geschlossenen Wachstumsfugen; Knorpel befindet sich nur noch als permanenter Gelenkknorpel an den Enden der Knochen. (Mackie et al. 2008, S. 48)



**Abbildung 5:** Mikroskopisches Präparat der Epiphysenfuge in H.E. Färbung (500fache Vergrößerung). **A** Proliferierende Zone. **B** Hypertrophe Zone. **C** Verknöcherungszone. (<https://www.amboss.com/de/library#xid=IJ0v8S&term=Ossifikation>)

## 1.4 TGF- $\beta$ -Superfamilie

Endochondrale Ossifikation ist ein fein abgestimmter und regulierter Prozess, an dem viele verschiedene Faktoren wie Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Parathormon-related Protein (PTHrP), Indian Hedgehog (Ihh) und Wnt beteiligt sind. TGF- $\beta$  und BMPs sind Teil einer Superfamilie, zu denen unter anderem auch Inhibin, Activin, Glial Derived Neurotrophic Factors (GDNFs), Anti-Müller-Hormon und Growth and Differentiation Factors (GDFs) gehören (Wang et al. 2014). Dabei ist jedes dieser strukturell verwandten polypeptiden Glykoproteine fähig, zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Determinierung der Zelllinie, Differenzierung, Adhäsion, Motilität und Zelltod zu regulieren (Ferguson et al. 2000; Massagué 1998).

### 1.4.1 TGF- $\beta$ -Signalweg

TGF- $\beta$  kommt in Säugetieren in drei Isoformen (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3) vor, wobei sich die größte Menge dieser Peptide im Knochen und Knorpel befindet. Dies verdeutlicht die wichtige Rolle, die TGF- $\beta$  bei der Regulierung des Skelettwachstums spielt (Ballock et al. 1993). TGF- $\beta$  Signale werden initiiert durch Bindung eines Liganden an einen heterodimeren Serin/Threonin-Kinase-Rezeptor-Komplex, bestehend aus dem TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II und TGF- $\beta$  Rezeptor Typ I (Massagué 1998). Bisher sind sieben Typ I-Rezeptoren, spezifisch für die TGF- $\beta$ -Superfamilie, identifiziert worden, welche auch Activin Rezeptor-like Kinase (ALK) genannt werden. ALK5 vermittelt dabei TGF- $\beta$ -Signale, während ALK3 und ALK6 spezifisch durch BMPs aktiviert werden (Li et al. 2005). Bindet TGF- $\beta$  an den Typ II-Rezeptor, phosphoryliert dieser den Typ I-Rezeptor an Serin- und Threoninresten der GS Domäne sowie an Ser165 in der juxtamembranen Region (Callahan et al. 2002; Feng und Derynck 1997). Im canonical Signalweg werden daraufhin Smad2 und Smad3 phosphoryliert, die mit Smad4 einen Komplex bilden, in den Nukleus translozieren und die Genexpression der TGF- $\beta$ -Zielgene regulieren. Im non-canonical Signalweg hingegen aktiviert TGF- $\beta$  den MAP-Kinase-Signalweg, inklusive

ERK, JNK und p38 (Coricor und Serra 2016; Li et al. 2005; Massagué 1998). Die verschiedenen Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie werden initial als große Vorläufermoleküle mit einer amino-terminalen Signalsequenz und einer Prodomäne variabler Größe, auch „latency associated Peptide“ (LAP) genannt, synthetisiert (Gray und Mason 1990). Das aktive Signalmolekül besteht letztendlich aus Hetero- oder Homodimeren aus dem Carboxy-terminalen Segment. LAP kann auch assoziiert mit dem Carboxy-terminalen Signalfragment bleiben, um einen inaktiven Komplex zu bilden. „Latent TGF- $\beta$ -binding proteine-1 (LTBP1)“, welches über Disulfide mit LAP verbunden ist, ist beteiligt bei der Sekretion, Lagerung und Aktivierung dieses Komplexes (Massagué 1998). Weitere Faktoren, involviert in der Aktivierung des inaktiven Komplexes, sind Proteasen, Calcitriol, Thrombospondin, Plasmin oder ein niedriger pH-Wert und spielen somit eine Rolle in der physiologischen Regulation der TGF- $\beta$  Aktivität. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar (Gelb et al. 1990; Kingsley 1994; Pedrozo et al. 1998; Thorp et al. 1992).

Aktivierung und Phosphorylierung der TGF- $\beta$ -Rezeptoren und Smad-Moleküle unterliegen der strengen Kontrolle und Regulation von inhibitorischen und stimulatorischen Faktoren. So kann Smad7 als inhibitorisches Smad-Molekül stabil mit dem TGF- $\beta$  Rezeptorkomplex assoziieren, wird jedoch nicht phosphoryliert und inhibiert somit die Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 (Nakao et al. 1997). SB431542 ist ein potenter, spezifischer Inhibitor der Kinase-Aktivität des TGF- $\beta$  Typ I Rezeptors und verhindert die in vitro-Phosphorylierung von Smad3 (Inman et al. 2002; Callahan et al. 2002). Im non-canonical Signalweg phosphoryliert ERK Smad2 und Smad3 an ihrer Linker-Domäne und inhibiert dadurch ihre nukleare Translokation (Kretschmar et al. 1999) und der Komplex aus Calmodulin-abhängiger PKII/PKC phosphoryliert die MH1 Domäne von Smad3 und interferiert folglich mit seiner DNA-Bindung (Wicks et al. 2000; Yakymovych et al. 2001). Im Gegensatz dazu aktiviert und vereinfacht JNK durch Phosphorylierung von Smad3 dessen Transport in den Nukleus (Engel et al. 1999; Li et al. 2005).

Auch Betaglycan und Endoglin können den TGF- $\beta$  Signalweg modulieren. Betaglycan ist ein Membran-verankertes Proteoglykan ohne intrazelluläre Kinase-Domäne, welches alle drei TGF- $\beta$ -Isoformen mit hoher Affinität binden kann

(Massagué 1998). Es erleichtert die Bindung der TGF- $\beta$  Moleküle an ihre Rezeptoren, insbesondere von TGF- $\beta$ 2, das normalerweise eine schwächere intrinsische Affinität zu TGF- $\beta$  Typ II Rezeptor aufweist als die beiden anderen Isoformen (López-Casillas et al. 1993; Andres et al. 1991). Im Gegensatz zu Betaglycan wird bei Endoglin ein inhibitorischer Effekt auf den TGF- $\beta$  Signalweg vermutet (Lastres et al. 1996; Massagué 1998).

TGF- $\beta$  stellt einen wichtigen Stimulus für die Initiierung der Differenzierung von MSCs zu Chondrozyten dar, wird dementsprechend im kondensierenden Mesenchym sowie in proliferierenden und prä-hypertrophen Chondrozyten exprimiert, jedoch nicht mehr während der terminalen Differenzierung in hypertrophen Chondrozyten (Pelton et al. 1990; Millan et al. 1991). TGF- $\beta$  stimuliert dabei die Chondrogenese in vivo und in vitro (Schofield und Wolpert 1990; Indrawattana et al. 2004; Barry et al. 2001; Bian et al. 2011). Injektion von TGF- $\beta$  ins Periost von Ratten oder in Knorpeldefekte von Minischweinen führte zur chondrogenen Differenzierung und Knorpelbildung (Joyce et al. 1990; Hunziker 2001). Weitere Studien zeigen, dass TGF- $\beta$  die Chondrozyten, durch vermehrte Expression knorpelspezifischer Marker wie Kollagen II und Aggrecan, in einem prähypertrophen Phänotyp hält (Pateder et al. 2001). Dies gelingt zum einen durch Phosphorylierung und damit Stabilisierung des Sox9-Proteins (Coricor und Serra 2016), zum anderen durch Stimulation der PTHrP-Expression. Jedoch spielt TGF- $\beta$  nicht nur eine kritische Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung der Chondrogenese, sondern auch in der Inhibierung der terminalen Differenzierung (Ballock et al. 1993). So konnte in Arbeitsgruppen von Yang und Ferguson gezeigt werden, dass Mäuse mit einem homozygot negativem Smad3 Gen eine Osteoarthritis-ähnliche, degenerative Gelenkkrankheit entwickelten, charakterisiert durch progressiven Verlust an Gelenkknorpel, Bildung von Osteophyten, geringerer Produktion an Proteoglykanen und abnormal erhöhter Expression von Kollagen X im synovialen Gelenkspalt (Yang et al. 2001; Ferguson et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei Überexpression eines Kinase-defekten TGF- $\beta$  Typ II-Rezeptors feststellen (Serra et al. 1997).

## 1.4.2 BMP-Signalweg

BMPs (Bone morphogenetic proteins) bilden eine Untergruppe der TGF- $\beta$ -Superfamilie. Ursprünglich definiert durch ihre Fähigkeit zur ektopen Knorpel- und Knochenbildung in Ratten (Urist 1965), ist ihre Bezeichnung heutzutage jedoch etwas irreführend: BMPs sind nämlich an vielen weiteren biologischen Prozessen wie Zellproliferation, Determinierung der Zelllinie und Apoptose beteiligt, die in verschiedenen Geweben einschließlich Knochen, Knorpel, Blutgefäße und Organen stattfinden (Di Chen et al. 2004; Miyazono et al. 2010).

Während BMP2, 4, 6, 7 und 9 unter anderem als osteogenetische Faktoren gelten, ist BMP3 ein negativer Regulator der Knochendichte und BMP13 ein starker Inhibitor der Knochenbildung (Wang et al. 2014).

Auch hinsichtlich ihres Expressionsmusters unterscheiden sich die einzelnen BMP-Mitglieder: BMP2, 4 und 5 werden im Perichondrium exprimiert, BMP7 sowohl im Perichondrium als auch in proliferierenden Chondrozyten, BMP6 insbesondere in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten (Yoon und Lyons 2004).

Ebenso wie TGF- $\beta$  werden BMPs als Vorläufermoleküle synthetisiert. Durch extrazelluläre Proteolyse werden die C-terminalen Dimere von der Prodomäne gespalten und sind somit biologisch aktiv (Hogan 1996). Im canonical Signalweg wird, ähnlich wie bei TGF- $\beta$ , die Signaltransduktion durch das Binden der BMPs an einen heterotetrameren Rezeptorkomplex initiiert, bestehend aus jeweils zwei Dimeren eines Typ-I und Typ-II Serin/Threonin Kinase-Rezeptors.

Drei der insgesamt 7 Typ-I-Rezeptoren binden spezifisch BMPs: Typ-IA (BMPRII/ALK3), Typ-IB (BMPRII/ALK6) und Typ-1A-Activin-Rezeptor (ActR-1A/ALK2). Diese werden wiederum an einer spezifischen Region (GS-Box) durch einen der drei Typ-II-Rezeptoren (Typ-II-BMP Rezeptor (BMPRII), Typ-II-Activin-Rezeptor (ActR-IIA) und Typ-IIB-Activin-Rezeptor (ActR-IIB)) phosphoryliert. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor wiederum phosphoryliert Smad 1/5/8 an einem C-terminalen SSXS Motiv. Die phosphorylierten Smads1/5/8 bilden daraufhin mit Co-Smad4 einen Komplex, translozieren in den Nukleus und regulieren die Zielgene des BMP-Signalwegs (Di Chen et al. 2004). Smad-unabhängige Signalwege (non-canonical) enthalten TAK-1,

eine Serin-Threonin Kinase der MAPKKK Familie, sowie PI3K/Akt, P/kc, Rho-like GTPase und viele weitere Effektoren (Zhang 2009; Yamaguchi et al. 1995). Eine Vielzahl von Inhibitoren greifen in die Regulation des BMP-Signalweges ein: extrazelluläre Antagonisten (Noggin, Chordin, Follistatin, Ventroptin und Gremlin) hindern die Bindung der BMP-Moleküle an ihre spezifischen Rezeptoren, während intrazelluläre Antagonisten die Smad-Signalkaskade entweder blockieren (Smad6 und Smad7, Dorsomorphin, tob, Smad Ubiquitin Regulatory factor-1 (smurf1)) oder nur das BMP Signal abschwächen (small C-terminal domain phosphatase-SCP). Der Pseudorezeptor BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) ist ein Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor und ähnelt strukturell dem BMP Typ-I Rezeptor. Er besitzt jedoch eine kürzere intrazelluläre Domäne, die keine Kinaseaktivität ausübt. Somit verhindert BAMBI sowohl TGF- $\beta$ -, als auch BMP-vermittelte Signaltransduktion durch Blockade der Interaktion zwischen Typ-I und Typ-II Rezeptor. BAMBI wird während der frühen Embryogenese mit BMP4 ko-exprimiert (Onichtchouk et al. 1999; Grotewold et al. 2001).

Im Rahmen der endochondralen Ossifikation spielen insbesondere BMP2, 4 und 7, aber auch BMP5 und 6 eine Rolle; ihre Gene werden in bestimmten räumlichen und zeitlichen Mustern exprimiert. Bereits für die ersten Schritte in der Embryogenese sind BMPs unerlässlich. Mäuse, denen BMP2 und BMP4 fehlten, waren nicht lebensfähig. Eine Inhibierung des BMP-Signalwegs durch Noggin oder Knock-out von BMPR-IA und BMPR-IB führten in Mäusen und Hühnern zu fehlender mesenchymaler Kondensation und somit zur Blockade jeglicher chondrogener Differenzierung (Bandyopadhyay et al. 2006; Di Chen et al. 2004; Pizette und Niswander 2000). Der BMP-Signalweg stimuliert chondrogene Differenzierung durch verstärkte Expression von Kollagen II, Aggrecan und Sox9 (Chimal-Monroy et al. 2003; Schmitt et al. 2003; Lee et al. 2013; CHEN 1991; Duprez et al. 1996). BMP4 ist in der Lage, Chondrogenese in MDSCs (Muscle-Derived Stem Cells) (Kuroda et al. 2006) und ADSCs (Adipose-Derived Stem Cells) (Shi et al. 2013) in vitro und in vivo zu induzieren und zu verstärken. Schließlich sind BMPs auch essenziell bei der Hypertrophie und terminalen Differenzierung in Chondrozyten. Zugabe von BMPs

oder Aktivierung der BMP-Rezeptoren regt die Chondrozyten zur terminalen Differenzierung an und führt zu einer gesteigerten Expression typischer Hypertrophie-Marker wie ALP und Kollagen X, dessen Promotor eine „BMP Responsive Transcription“-Region aufweist und somit direkt stimuliert wird (Volk et al. 1998; Grimsrud et al. 2001; Leboy et al. 1997). Die Blockade von BMP-Signalen durch Noggin oder einen dominant-negativen Typ-II Rezeptor inhibiert Kollagen X-Expression, hält die Chondrozyten in einem prähypertrophen Zustand und verhindert somit die terminale Differenzierung (Enomoto-Iwamoto et al. 1998; Pathi et al. 1999; Grimsrud et al. 2001). Insbesondere BMP4 gilt als effektiver Induktor der Hypertrophie (Shum et al. 2003; Hatakeyama et al. 2004). In vivo-Experimente zeigen, dass eine Überexpression von BMP4 in transgenen Mäusen zu einer vergrößerten hypertrophen Knorpelzone führt (Tsumaki et al. 2002) und in vitro-Versuche belegen, dass BMP4 einen stärkeren pro-hypertrophen Effekt besitzt als das Thyroidhormon (Karl et al. 2014). Eine Mutation in ALK2 und die Hochregulation von BMP4 verursachen Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), eine autosomal dominante Erkrankung, gekennzeichnet durch progressive Ossifikationen von Muskeln, Bändern und Sehnen (Hannallah et al. 2004; Miyazono et al. 2010). Aber auch mit anderen Signalwegen steht der BMP-Signalweg in einem engen Zusammenhang. So führt die Expression von *Ihh* zu einer gesteigerten BMP-Expression, wodurch eine positive Rückkopplung zwischen diesen beiden Regelkreisen entsteht und eine geregelte Koordination von Proliferation und Differenzierung ermöglicht wird (Yoon und Lyons 2004; Minina et al. 2001; Pathi et al. 1999). Im Gegensatz dazu gilt der Fibroblast Growth Factor (FGF) -Signalweg als antagonistischer Gegenspieler, der die BMP4- und *Ihh*-Expression reduziert und somit die Proliferation inhibiert (Minina et al. 2002).

Zusammenfassend sind beide Signalwege, sowohl TGF- $\beta$ , als auch BMP, notwendig für eine erfolgreiche Kondensation mesenchymaler Stammzellen sowie zur Induktion und Förderung der darauffolgenden chondrogenen Differenzierung. Lediglich in den späteren Stadien der Skelettentwicklung unterscheiden sie sich grundsätzlich.

Während TGF- $\beta$  die terminale Differenzierung verhindert und die Chondrozyten in einem prähypertrophen Stadium hält, fördert BMP die Hypertrophie in diesen Zellen.

### 1.4.3 Transkriptionelle Regulation

Intensive Forschung der letzten Jahre zeigte, dass in der transkriptionellen Regulation der Chondrogenese die Faktoren Sox9 und Runx2 eine zentrale Schlüsselfunktion einnehmen.

Sox9 gehört zu der SRY (Sex-determining Region on the Y chromosome) - Subgruppe der DNA-bindenden Proteinfamilie mit einer high-mobility-group (HMG)-Domäne. Diese Proteinfamilie nimmt eine wichtige Funktion bei einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen wie Geschlechtsdeterminierung, Neurogenese und Skelettbildung ein (Lefebvre et al. 1998). Während der Chondrogenese wird Sox9 in allen Chondroprogenitorzellen und differenzierten Chondrozyten exprimiert, nicht jedoch in hypertrophen Chondrozyten (Ng et al. 1997). Die Notwendigkeit von Sox9 für die chondrogene Differenzierung zeigt sich darin, dass heterozygote Mutationen von Sox9 im Menschen zur Kampomelen Displasie führen (Ikeda et al. 2004). Sox9 wird für die mesenchymale Kondensation und für die chondrogene Differenzierung benötigt. Dabei bindet und aktiviert Sox9 Chondrozyten-spezifische Enhancer-Elemente in Col2a1, Col9a1, Col11a1 und Aggrecan in vitro (Akiyama et al. 2002; Ikeda et al. 2004; Sekiya et al. 2000). Inaktivierung von Sox9 vor der mesenchymalen Kondensation führt zu einem Knorpel- und Knochenverlust, während Deletion von Sox9 nach Kondensation zu einem Differenzierungsstopp der Chondrozyten vor dem hypertrophen Stadium und der terminalen Differenzierung führt. Somit hilft Sox9 entscheidend dabei, den Phänotyp des permanenten Gelenkknorpels (Furumatsu et al. 2009) aufrechtzuerhalten. Dies erfolgt unter anderem durch direkte Unterdrückung der Expression hypertropher Marker wie Kollagen X, Osteocalcin, ALP und Runx2 (Akiyama et al. 2002; Karamesinis et al. 2017; Dy et al. 2012). Heterozygote Sox9-mutierte Mäuse zeigten eine Vergrößerung der hypertrophen Zone in der Wachstumsfuge sowie vorzeitige Mineralisierung des



Knorpels (Bi et al. 2001). Sox9 benötigt zur Stimulierung der chondrogenen Differenzierung zwei weitere Sox-Familienmitglieder, nämlich L-Sox5 und Sox6. Diese werden erst in der Chondrogenese, nicht jedoch während der mesenchymalen Kondensation ko-exprimiert und sind für die suffiziente Expression der chondrogenen Markergene notwendig (Ikeda et al. 2004). Die Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 wird von verschiedenen interagierenden Signalwegen und Molekülen reguliert. So wird die Expression von Sox9 sowohl vom TGF- $\beta$ -Signalweg mittels Smad3 (Furumatsu et al. 2009), als auch vom BMP-Signalweg induziert (Zhao et al. 2017; Chimal-Monroy et al. 2003). PTHrP beeinflusst positiv die Expression und die Effekte von Sox9, während Thyroxin (T4),  $\beta$ -Catenin und Retinsäure diese inhibieren (Guo et al. 2006; Sekiya et al. 2000; Okubo und Reddi 2003; Dy et al. 2012). Neue Studien beschäftigen sich auch intensiv mit dem Einfluss von Micro-RNAs. Dies sind kurze, nicht-kodierende RNA-Moleküle aus 17-25 Nukleotiden, die die Genexpression post-transkriptionell regulieren können. MiRNA-140, eine knorpelspezifische micro-RNA, erhöht die Expression von Sox9 und übt somit einen antihypertrophen Effekt aus (Li et al. 2018).

Runx2 ist ein Mitglied der Cbf-Familie (Core binding factor), bestehend aus heterodimeren Transkriptionsfaktoren mit einer DNA-Bindungsdomäne, homolog zum Drosophila Runt Gen. Die  $\alpha$ -Untereinheit von Cbf besteht entweder aus Runx1, Runx2 oder Runx3, während für die  $\beta$ -Untereinheit bisher nur PEBP2/Cbfb bekannt ist (Lee et al. 2000; Wang et al. 2004). Runx2 wird überhaupt nicht in artikulären Chondrozyten exprimiert, lediglich schwach in proliferierenden Chondrozyten, jedoch besonders ausgeprägt in hypertrophen Chondrozyten sowie in Osteoblasten (Kuboki et al. 2003; Wang et al. 2004). Runx2, zusammen mit Runx3, ist unerlässlich für die Knochenbildung sowie für die Induktion der Hypertrophie und der terminalen Differenzierung der Chondrozyten (Yoshida et al. 2004). Mäuse, denen der Transkriptionsfaktor fehlte, entwickelten ein knorpeliges Skelett ohne Anzeichen von endochondraler oder intramembranöser Knochenbildung (Geoffroy et al. 2002). Retroviral gesteigerte Runx2-Expression hingegen führte zu ektopter Ossifikation mit gesteigerter Expression hypertropher Marker wie Kollagen X, MMP13 und ALP (Ueta et al. 2001; Wang et al. 2004; Inada et al. 1999; Yoshida et al. 2004). Gesteigerte

Runx2-Expression in transgenen Mäusen führte zudem zur Hypertrophie und endochondraler Ossifikation in Nasenseptum, Gelenkknorpel und Trachealspangen und somit in Knorpelgewebe, in dem Chondrozyten normalerweise den Hypertrophie-Prozess nicht durchlaufen (Kuboki et al. 2003). Ebenso wie Sox9 ist auch Runx2 ein Zielgen des TGF- $\beta$ - und BMP-Signalwegs. So benötigt Runx2 für die Induktion der osteoblastenspezifischen Genexpression die Kooperation mit BMP-aktivierten Smads (Lee et al. 2000; Phimphilai et al. 2006). Ein Verlust von Smad4 führte beispielsweise zu einer geringeren Runx2 Expression und somit zur Inhibierung der Chondrozyten-Reifung und Ossifikation (Yan et al. 2018).

FGF2 steigert die Phosphorylierung von Runx2 (Wang et al. 2004), während PTHrP (Guo et al. 2006) sowie die Micro-RNAs MiR-221 (Zhang et al. 2017) und MiR-445-3p (Zhang et al. 2015b) die mRNA Levels und Expression von Runx2 signifikant herunterregulieren.

## 1.5 Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Auch der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist in viele biologische Prozesse involviert und gilt als ein entscheidender Faktor für die Regulation der Entwicklung und Homöostase in Knochen, Knorpeln und Gelenken (Yuan et al. 2016). Der canonical Signalweg wird initiiert durch Bindung von Wnt's an den Wnt-Rezeptor-Komplex, bestehend aus den Plasmamembran-Rezeptoren LDL-Receptor-Related Protein (LRP) 5/6 und den Ko-Rezeptoren Frizzled. Diese Bindung wiederum aktiviert die Disheveled-Proteine, die daraufhin den so genannten " $\beta$ -Catenin Destruktionskomplex" inhibieren, ein Konstrukt aus Axin, Adenomatous Polyposis Coli (APC) und Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3). In der Abwesenheit von Wnt's, wird  $\beta$ -Catenin von GSK-3 phosphoryliert, von  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -Transducin repeat containing protein) ubiquitiniert und in Proteasomen abgebaut. Bei Anwesenheit von Wnt's hingegen blockieren Disheveled-Proteine den Destruktionskomplex, nicht-phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin häuft sich im Zytoplasma an, transloziert in den Nukleus, bindet mit seiner N-terminalen Domäne Proteine der T-cell-factor/lymphoid-enhancer-factor-(TCF/LEF)

Familie und aktiviert die Transkription der Zielgene (Tamamura et al. 2005; Tu et al. 2007; Yuan et al. 2016).

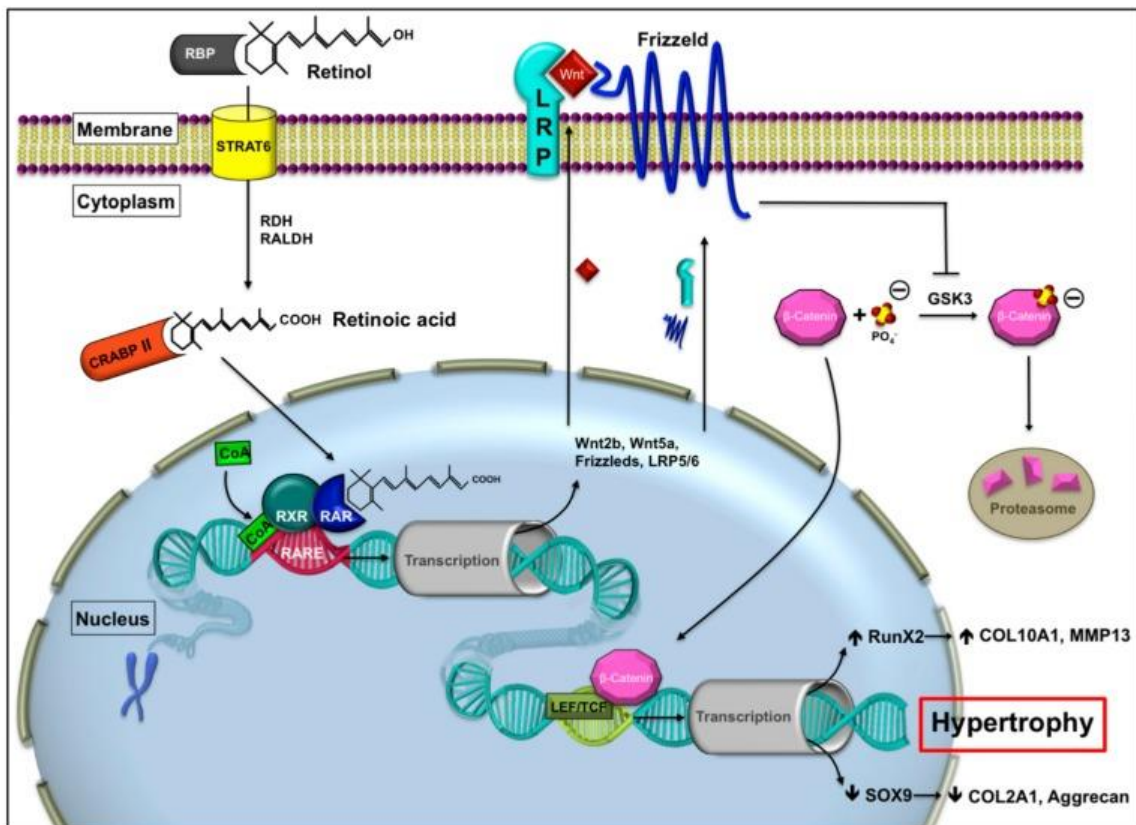
Der non-canonical,  $\beta$ -Catenin-unabhängige Signalweg umfasst die Aktivierung kalzium-sensitiver Effektoren wie die Calmodulin Kinase (CaMK), Calcineurin (CaN), CREB und Proteinkinase C (PKC), sowie die Jun N-terminale Kinase (JNK) und die G-Protein RhoA/Rho-assoziierte Kinase (Rock) (Bradley und Drissi 2011; Usami et al. 2016).

Mitglieder des canonical Wnt-Signalwegs sind hoch exprimiert in mesenchymalen Zellen der osteochondrogenen Zelllinien, werden während der chondrogenen Differenzierung jedoch herunterreguliert und sind in großen Mengen in hypertrophen Chondrozyten vorhanden (Naito et al. 2015; Tamamura et al. 2005; Day et al. 2005). Eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges fördert die Hypertrophie der Chondrozyten, vereinfacht die Formierung von primären und sekundären Ossifikationszentren und induziert die perichondrale Knochenbildung durch direkte Regulation und Stimulation von Runx2, Kollagen X, ALP, MMP13 und Osteocalcin (Dao et al. 2012; Gaur et al. 2005; Hill et al. 2005). Verschiedene intrazelluläre und extrazelluläre Signalmoleküle regulieren den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.

Untersuchungen verschiedener Inhibitoren wie sFRP1 (secreted Frizzled-related protein-1) oder PKF118-310, welche direkt an Wnt's binden (Huang et al. 2018) oder DKK1 (Dickkopf-1), das an die LRP5/LRP6 Untereinheit des Wnt-Rezeptorkomplexes bindet (Kawano und Kypta 2003) und des Signalmoleküls SM04690 (Deshmukh et al. 2018) steigern die chondrogene Differenzierung durch erhöhte Expression von Sox9, Kollagen II und Proteoglykanen (Gaur et al. 2006; Leijten et al. 2013; Zhong et al. 2016).

Funktionsverlust oder Neutralisierung der Inhibitoren oder direkte Stimulierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalwegs beispielsweise durch das Molekül BIO (6-bromoindirubin-3-oxim) (Huang et al. 2018), welches GSK-3 inhibiert, resultierten in einer Dedifferenzierung der Chondrozyten, einem vermehrten Kalzifizieren der hypertrophen Zone, einer verstärkten Ossifikation mit hohen Expressionsniveaus von Runx2, Osx und Osteocalcin (Ryu et al. 2002; Zhong et al. 2016; Gaur et al. 2006), bis hin zu einem Arthrose-ähnlichem Phänotyp mit Osteophytenbildung und

Knorpelfaserung in 8 Monaten alten Mäusen (Zhu et al. 2009). Aber auch eine Inhibierung des non-canonical Signalwegs in PKC $\delta$ -negativen Mäusen führte zu verkürzten hypertrophen Zonen und verzögerter Chondrozytenreifung (Tu et al. 2007).



**Abbildung 6:** Mögliche Interaktion zwischen dem Wnt/ $\beta$ -Catenin und dem Retinsäure-Signalweg. Retinsäure transloziert mittels dem zellulären Retinsäure-Bindungsprotein II (CRABP II) in den Nucleus und bindet an den RA-Rezeptor. Dies aktiviert wiederum die Genexpression der Wnt-Proteine, Rezeptoren und Co-Rezeptoren und resultiert in einer verstärkten Expression hypertropher Marker, wie RUNX2, MMP13 und Kollagen X. (**RBP** Retinoid binding protein, **STRAT6** stimulated by retinoic acid, **RDH** retinol dehydrogenase, **RALDH** retinaldehyde dehydrogenase, **RAR** retinoic acid receptor, **RXR** retinoic X receptor, **CRABP II** cellular retinoic acid binding protein, **RARE** retinoic acid response element, **GSK3** glycogen synthase kinase 3, **CoA** co-activator, **LRP** lipoprotein receptor related protein, **LEF/TCF** lymphoid enhancer binding factor/transcription factor) (Riedl et al. 2020).

## 1.6 Retinsäure-Signalweg

Der Retinsäure-Signalweg spielt eine große Rolle bei Zelldifferenzierung und Wachstum, beides wichtige Vorgänge während der Embryogenese und Tumorentstehung, und ist für die vollständige Entwicklung von Haut, Haaren, Augen, Knochen, Zähnen und vielen weiteren Organen unabdingbar. Die Einbindung des Retinsäure-Signalwegs in die Skeletogenese wurde erstmals vor 50 Jahren in Studien näher beschrieben, wonach sowohl Hypervitaminose A als auch Hypovitaminose A zu schweren kongenitalen Malformationen führten. Die all-trans Retinsäure (ATRA, im folgenden RA genannt) entsteht via zwei Oxidationsschritten aus Vitamin A, gilt als das potenteste Derivat, bindet an das zelluläre CRAB (cellular retinoic acid binding) I oder II-Protein, wird in den Nukleus transportiert und bindet an seine Zielrezeptoren, die Retinsäurerezeptoren (Mammadova et al. 2016). Retinsäurerezeptoren bestehen aus RARs (Retinoic acid receptors) und RXRs (Retinoid- X-Receptors) und agieren als Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren, wobei RARs zur Subgruppe I (ebenso wie der Thyroidhormon-Rezeptor, der Vitamin-D-Rezeptor und der Peroxisom-Proliferativ-aktivierter-Rezeptor) der Superfamilie der Nuklearen Hormonrezeptoren gehören (Kafienah et al. 2007; Underhill und Weston 1998). RARs und RXRs bestehen aus drei verschiedenen Isotypen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und mehreren Isoformen, wodurch eine große Gruppe an möglichen Heterodimeren generiert werden kann. Ein RARs/RXRs Heterodimer bindet an Retinoic acid response elements (RARE), kurze DNA-Sequenzen in den regulatorischen Regionen der Zielgene. Reguliert werden RARs durch Co-Repressoren (CoR) und Co-Aktivatoren (CoA) (Mammadova et al. 2016). Während der embryonalen Extremitätenentwicklung werden RAR $\alpha$  und RAR $\gamma$  früh und in sich überlappenden Regionen exprimiert. RAR $\beta$  ist zunächst im proximalen Mesenchym präsent und später begrenzt auf perichondrale Zellen und interdigitale Zonen. Während RAR $\alpha$  im weiteren Verlauf diffus im Knorpel exprimiert wird, befindet sich RAR $\gamma$  vorwiegend in prächondrogenen mesenchymalen Kondensationen und in sich differenzierenden Chondrozyten (Koyama et al. 1999; Hoffman et al. 2003).

Effekte des RA-Signalweges sind sehr komplex, vielfältig und abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen. Bereits in der frühen Phase der Skeletogenese spielt Retinsäure eine entscheidende Rolle während der Chondrogenese und kann, je nach Konzentration, zu entsprechenden Defekten im Skelett führen. Zur Initiierung der Chondrogenese und Expression eines chondrogenen Phänotyps ist die Repression und Herunterregulation von RARs eine Voraussetzung. Dominant-negative Formen von RARs oder RAR-Antagonisten führten zu einer gesteigerten Chondrogenese mit vermehrter Expression von Sox9, Kollagen II, sowie zu einer erhöhten Proteoglykan-Synthese (Hoffman et al. 2003; Cash et al. 1997, 1997, 1997; Jiang et al. 1995; Weston et al. 2000; Weston et al. 2002).

Die Zugabe von all-trans Retinsäure, einem pan-RAR Agonisten, oder einem spezifischen RAR-Agonisten (RAR- $\alpha/\beta/\gamma$ -Agonist) blockiert zum einen die Progression vom präknorpeligen Kondensationszustand zur Formation von Knorpelaggregaten durch gesteigerte Expression von N-Cadherin und den assoziierten Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin (Cho et al. 2003), zum anderen führt es zu verminderter GAG-Synthese, Reduktion von Knorpelmatrix und verminderter Expression von knorpelspezifischen Genen wie Sox9, Aggrecan und Kollagen II (Horton et al. 1987; Jiang et al. 1995; Zhang et al. 2009; Zhang et al. 2015a; Galdones und Hales 2008).

Es gibt jedoch auch Studien, die einen pro-chondrogenen Effekt bei physiologischen Konzentrationen von RA unter serum-freien Bedingungen zeigten (Ide und Aono 1988; Langille et al. 1989; Paulsen et al. 1988).

Bereits in früheren Tierversuchen konnte belegt werden, dass Hypervitaminose A zu einer verbreiterten hypertrophen Zone, zu einer frühen Mineralisierung und zu einem vorzeitigen Verschluss der Wachstumsfuge führt. So induziert beispielsweise RA die Expression von Kollagen X (Pacifci et al. 1991), unter anderem durch direkte Bindung von RARs an eine RA-responsive Region des Kollagen X-Promotors (Cohen et al. 2006), sowie von weiteren für die endochondrale Ossifikation wichtigen hypertrophen und osteogenen Markern wie Runx2, ALP, MMP13, Col1, Osteopontin, Osteonectin und MafB (Drissi et al. 2003; Kawaguchi et al. 2005; Koyama et al. 1999; Li et al. 2014; Weston et al. 2003; Zhang und Ross 2013; Masuda et al. 2015).

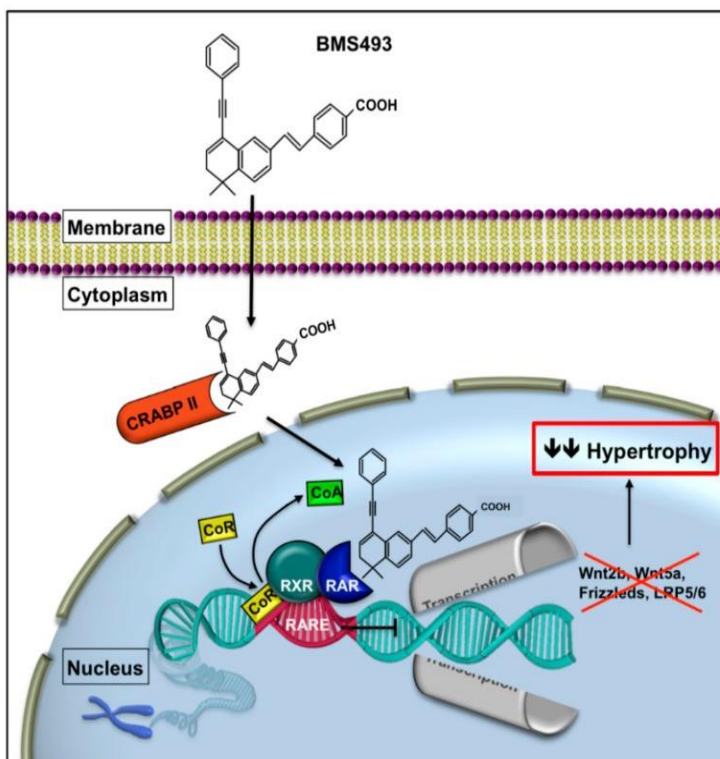
Im Rahmen der skelettalen Entwicklung interagiert der RA-Signalweg mit zahlreichen weiteren Signalwegen. So zeigten Studien, dass der RA-Signalweg seinen anti-chondrogenen Einfluss zum einen durch Inhibierung der Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 und somit durch Unterdrückung des TGF- $\beta$ -Signalweges ausübt (Yu und Xing 2006; Zhang et al. 2009); zum anderen geschieht dies auch durch gesteigerten Abbau der Knorpelmatrix, in dem die Matrixmetalloproteinasen reguliert (Jiménez et al. 2001) und der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktiviert werden (Yasuhara et al. 2010; Shimono et al. 2011; Pavey et al. 2016). Während einige Studien ergaben, dass sich der RA- und der BMP-Signalweg antagonisieren, indem RA eine Reduktion der Phosphorylierung von Smad1/5/8 und BMP eine verminderte Aldh1a (Synthesemolekül von Retinsäure) Expression bewirken (Hoffman et al. 2006; Pavey et al. 2016; Shimono et al. 2011), zeigten andere Studien ein gegenteiliges Phänomen, nämlich eine Induktion des BMP-Signalweges durch RA mittels einer direkten Induktion der BMP-Expression sowie durch eine Steigerung der Smad-Phosphorylierungslevel (Li et al. 2003; Zhang et al. 2010). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf Spezies-spezifische Zelleigenschaften, unterschiedliche Kulturbedingungen und Applikationszeiten zurückzuführen sein.

Die klinische Relevanz des RA-Signalwegs zeigt sich unter anderem in Studien, in denen bei skelettal ausgewachsenen Mäusen und Ratten eine tägliche orale Dosis eines RAR-Agonisten die heterotope Ossifikation (HO), die durch Implantation eines rhBMP-2 beladenen Matrixgels und zusätzliche gezielte Traumata-Verletzungen induziert worden war, effektiv minderte (Shimono et al. 2010; Shimono et al. 2011; Pavey et al. 2016).

Trotz der immensen Fortschritte in den letzten Jahrzehnten wird weiterhin kontrovers diskutiert, welche Effekte der RA-Signalweg auf die Chondrogenese per se sowie im Zusammenspiel mit anderen Einflussfaktoren hat.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss all-trans Retinsäure und BMS493 auf die Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen in vitro haben. BMS493 (((E))4-[2-[5,5-dimethyl-8-(2-phenylethynyl)-5,6-dihydronaphthalen-2-yl]ethen-1-yl]benzoic acid) ist ein inverser Agonist, der durch Rekrutierung von Co-Repressoren und verminderter Expression von endogenem CYP26 die Funktion aller

drei RAR's Isoformen inhibiert und somit als potenter Silencer des RA-abhängigen Genaktivierungsprogramm gilt. Neben der Rekrutierung stabilisiert BMS493 auch die Bindung der Co-Repressoren mit dem Rezeptor, wodurch eine stärkere Signalunterdrückung erreicht wird, als mit einem reinen Antagonisten, welcher noch von einem Agonisten verdrängt werden kann (Germain et al. 2009; Yin et al. 2018). Frühere Studien zeigten, dass BMS493, wenn zu einem frühen Zeitpunkt der chondrogenen Differenzierung appliziert, einen stimulatorischen Effekt auf die Chondrogenese ausübt und in späten Phasen der Differenzierung zu einer Reduktion der Hypertrophie und verminderter Mineralisierung führt (Pfeifer et al. 2014).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Inhibierung des Retinsäure-Signalweges durch BMS493. BMS493 transloziert mittels dem zellulären Retinsäure-Bindungsprotein II (CRAB II) in den Nucleus und bindet an den RAR/RXR-Komplex. Durch Rekrutierung weiterer Co-Repressoren inhibiert der Rezeptorkomplex die Expression der Zielgene an Promoter-Region RARE. Die verminderte Expression von Wnts und Wnt-Rezeptoren und Co-Rezeptoren reduziert die hypertrophe Differenzierung. **RAR** retinoic acid receptor, **RXR** retinoic X receptor, **CRABP II** cellular retinoic acid binding protein, **RARE** retinoic acid response element, **CoA** co-activator, **CoR** co-repressor, **LRP** lipoproteinreceptor related protein, **LEF/TCF** lymphoid enhancer binding factor/transcription factor (Riedl et al. 2020).



## 2 Ziel der Studie

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) stellen als multipotente Zellen und dank einfacher Gewinnung eine vielversprechende Zellquelle zur Knorpelregeneration im Tissue Engineering dar. Den MSCs gelingt erfolgreich die Induktion eines hyalinen Knorpeltyps mit spezifischen Markern wie Sox9, Kollagen II und Aggrecan. Jedoch zeigten sowohl in vivo- und in vitro-Protokolle einen ungewollten Trend der Chondrozyten, hypertroph zu werden und sich in Richtung osteogener Differenzierung zu entwickeln. Somit durchlaufen mesenchymale Stammzellen einen ähnlichen Prozess wie in der endochondralen Ossifikation während der Embryogenese und es misslingt den Chondrozyten, den erwünschten Zustand eines Gelenkknorpel-Chondrozyts aufrecht zu erhalten. Die unkontrollierte hypertrophe Differenzierung der artikulären Chondrozyten wird als treibender Faktor für den Beginn und die Progression der Arthrose gesehen. Der hypertrophe Trend der MSCs ruft somit Bedenken bezüglich ihres Einsatzes für die Knorpelreparatur hervor. Gleichzeitig könnte jedoch für den Einsatz von MSCs im Knochen-Tissue-Engineering sprechen, dass MSCs einem ähnlichen Entwicklungsmuster folgen wie Chondrozyten im Rahmen der endochondralen Ossifikation.

Die genaue Regulation und Kontrolle der Hypertrophie in der Differenzierung von MSCs ist somit eine wichtige und notwendige Voraussetzung für ihren Einsatz im Knorpel- oder Knochen-Tissue-Engineering. Das in dieser Arbeit verwendete in vitro-Modell, in dem durch spezielle Wachstumsfaktoren und Mediumbedingungen ein hypertropher Phänotyp generiert werden konnte, bietet ein gutes System, um die verschiedenen Signalwege und Einflussfaktoren dieses Prozesses abzugrenzen und zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden insbesondere der Retinsäure-Signalweg und seine komplexen Auswirkungen auf die Chondrogenese und Hypertrophie untersucht. Ausgehend von bisherigen Studien bestand die Annahme, dass eine Inhibierung des RA-Signalweges die Chondrogenese fördert und die Hypertrophie hemmt, insbesondere wenn eine Hemmung des Signalweges in der Frühphase der Differenzierung stattfindet. Im Gegensatz dazu war durch eine Stimulierung des RA-Signalweges ein anti-chondrogener Effekt sowie eine verstärkte Hypertrophie-

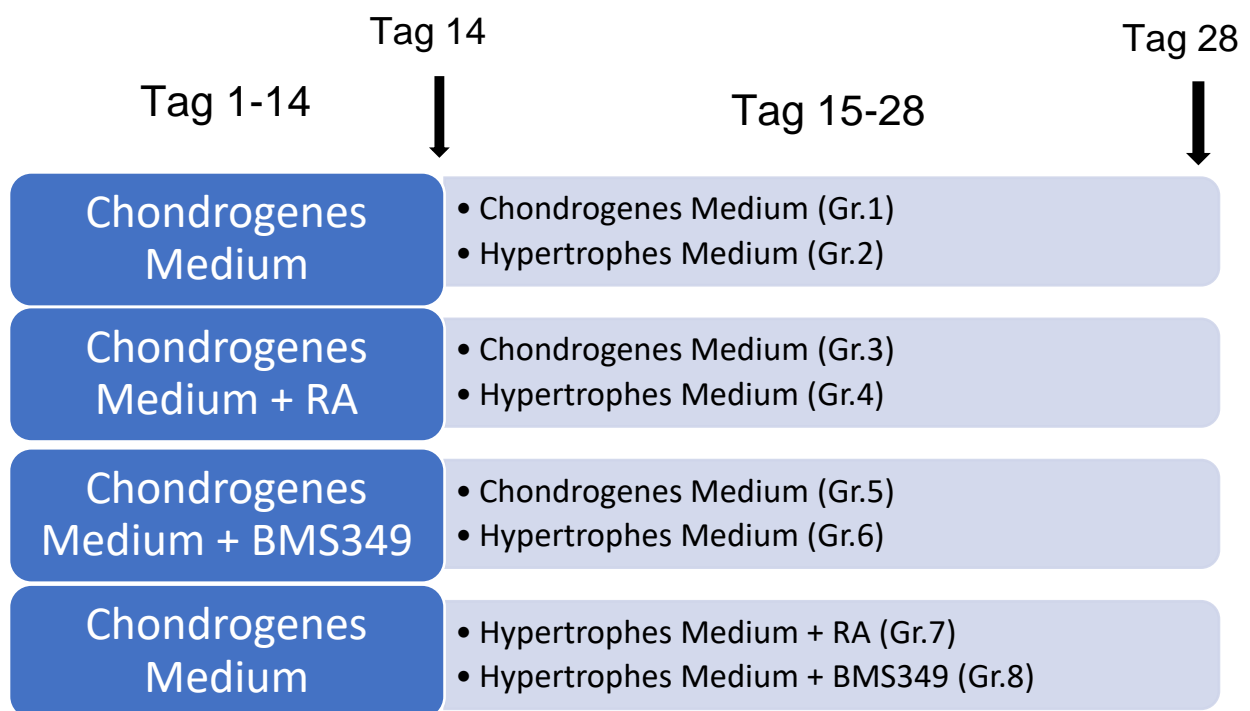
Induktion zu erwarten. Hierfür wurden Genexpressionsanalysen, histologische Färbungen und biochemische Analyseverfahren verwendet und die unterschiedlichen Auswirkungen der Inhibierung und Aktivierung des RA-Signalweges in chondrogenen und hypertrophen Gruppen miteinander verglichen.

### **3 Material und Methoden**

#### **Versuchsaufbau**

Für den Versuch wurden zwei Kontrollgruppen (Gruppe 1 und 2), sowie als Behandlungsgruppen drei BMS-Gruppen (Gruppe 5, 6 und 8) sowie drei RA-Gruppen (Gruppe 3, 4 und 7) gebildet. Sie unterschieden sich in der Zusammensetzung des Mediums (hypertrophe und chondrogene Bedingungen) sowie durch die Zugabe von 2µM BMS493 oder 10nM all-trans Retinsäure (siehe Tab 1).

Nach einer zweiwöchigen Proliferations- und Expansionsphase wurden die Zellen für 28 Tage in eine Pelletkultur überführt. Für 14 Tage erhielten die Zellen ein chondrogenes Medium, wobei bei je zwei Gruppen zusätzlich zum chondrogenen Medium entweder BMS493 oder Retinoic acid (RA) hinzugefügt wurde. Ab Tag 14 wurden bei einem Teil der Gruppen durch Entzug von Dexamethason und TGF-β und durch Zugabe von BMP4 ins Kulturmedium die Bedingungen für einen hypertrophen Phänotyp geschaffen. Der restliche Teil der Gruppen erhielt über die komplette Zeit ein chondrogenes Medium, sodass am Ende letztlich 8 Gruppen mit verschiedenen Bedingungen entstanden sind.



**Tabelle 1:** Schematischer Versuchsaufbau der Gruppen. Gr.1: chondrogen, Gr.: hypertroph, Gr3: chon+RA, Gr4: RA/Hyp, Gr5: chon+BMS, Gr.6: BMS/Hyp, Gr.7: Hyp+RA, Gr.8: Hyp+BMS

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Rekombinante Proteine und Inhibitoren

Chemisch	Applikation	Konzentration	Firma
BMS439	Pan-RAR inverser Agonist	2 $\mu$ M	Sigma Aldrich
all trans – Retinsäure	RAR-Agonist	10 nM	Sigma Aldrich
TGF- $\beta$ 1	TGF $\beta$ Ligand	10 ng/ml	R&D Systems
BMP4	BMP Ligand	25 ng/ml	R&D Systems

**Tabelle 2:** Rekombinante Proteine und Inhibitoren

### 3.1.2 Primers

Die Primer wurden von Eurofins synthetisiert, aufgereinigt und lyophilisiert. Es wurden Standardlösungen mit 100 µM (100 µmol/µl) hergestellt und bei -80° C gelagert. Die folgenden Primer wurden verwendet.

Gene	Primersequenz (forward)	Primersequenz (reverse)	Konzentration
PSMB4	GCTTAGCACTGGCTGCTTCT	GGACATGCTTGGTGTAGCCT	200 nM
COL1A1	ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC	ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC	200 nM
COL2A1	GGGCAATAGCAGGTTACGTA	TGTTTCGTGCAGCCATCCT	200 nM
COL10A1	CCCTCTTGTTAGTGCCAACC	AGATTCCCAGTCCTTGGGTCA	200 nM
MMP13	GACTGGTAATGGCATCAAGGGA	CACCGGCAAAGCCACTTTA	200 nM
Sox9	ACACACAGCTCACTCGACCTTG	AGGGAATTCTGGTTGGTCCTCT	200 nM
Runx2	ATACCGAGTGACTTTAGGGATGC	AGTGAGGGTGGAGGTAAGAAG	200 nM

**Tabelle 3** : In der PCR verwendete Primer und Konzentrationen

### 3.1.3 Antikörper

Antigen	Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Kollagen Typ I	Mouse anti-Kollagen Typ I (Sigma Aldrich)	1: 200	Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch)	1:100
Kollagen Typ II	Mouse anti-Kollagen Typ II (Calbiochem)	1:100	Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch)	1:100

Kollagen Typ X	Mouse anti-Kollagen Typ X (Quartett Immunodiagnostika und Biotechnologie GmbH)	1:20	Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-anti-Mouse (Jackson ImmunoResearch)	1:100
MMP13	Rabbit anti-MMP13 (Abcam)	1:100	Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-anti-Rabbit (Jackson ImmunoResearch)	1:500
Smad2	Smad2 (D43B4, Rabbit) (Cell Signaling Technology)	1: 200	Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit (Thermo Scientific)	1:100
Phospho-Smad2	Phospho-Smad2 (Ser465/467, Rabbit) (Cell Signaling Technology)	1:100	Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit (Thermo Scientific)	1:100
Phospho-Smad3	Phospho-Smad3 (Ser423/425, Rabbit) (Cell Signaling Technology)	1:20	Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit (Thermo Scientific)	1:100
Smad3	Anti-Smad3 (phospho S423+S425) antibody (Rabbit) (Abcam)	1:1000	Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit (Thermo Scientific)	1:500

Phospho- $\beta$ -Catenin	Phospho- $\beta$ -Catenin (Ser 675, Rabbit) (Cell Signaling Technology)	1:1000	Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit (Thermo Scientific)	1:1000
$\beta$ -Catenin	$\beta$ -Catenin (6B3, Rabbit) (Cell Signaling Technology)	1:1000	Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit (Thermo Scientific)	1:1000
$\beta$ -Actin	Anti-beta Actin antibody (ab8227, Rabbit) (Abcam)	1:20.000	Stabilized Peroxidase Conjugated Goat Anti-Rabbit (Thermo Scientific)	1:1000

**Tabelle 4:** Für Immunhistochemie und Western Blot Analyse verwendete Antikörper und Verdünnungen

### 3.1.4 Kits

Name	Applikation	Firma
Alkalische Phosphatase Kit	ALP-Färbung	Sigma Aldrich
Vector Elite Standard Kit	Histologie	Roth
RNeasy Mini Kit	RNA Isolierung und DNA Verdau	Quiagen
Quant-it PicoGreen dsDNA-Kit	DNA-Bestimmung	Invitrogen
Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit	cDNA-Synthese	Roche
Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	Real-Time-PCR	Agilent Technologies
Dura-Kit (Super Signal West Dura Stable Peroxide Buffer + S.S.W.D Enhancer Solution)	Western Blot Analyse	Thermo Scientific
Re-blot Plus	Stripping der Western Blot Membrane	Millipore

**Tabelle 5:** Liste der verwendeten Kits

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

#### TRIS-Puffer 0.2M

24.228g TRIS base (Roth)

In 900ml  $H_2O$  lösen

Mit HCl pH auf 7.0 einstellen

Mit  $H_2O$  auf 1l auffüllen

#### Waschpuffer

780ml TRIS 0.2M (Roth)

2220ml  $H_2O$

24,96g NaCl (Merck)

mit  $H_2O$  auf 3l auffüllen

#### Pepsin-Andaulösung

1mg Pepsin gelöst in 1ml McIlvaine-Puffer pH 3.6

#### McIlvaine-Puffer

Lösung A: 21g Zitronensäure 0.1M ad 1l A.d. (Roth)

Lösung B: 35.6g  $Na_2HPO_4$  0.2M ad 1l A.d. (Merck)

67.8ml Lösung A + 32.2ml Lösung B, bei pH 3,6

#### ABC-Komplex (Vector Elite Standard Kit, Roth)

2,5ml TRIS-Puffer 0.1M (pH 7,0)

+ 1 Tropfen Lösung A = 40  $\mu$ l

+ 1 Tropfen Lösung B = 40  $\mu$ l

30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren



### **Blockingpuffer**

120ml TRIS 0.2M (Roth)

2400mg NaCl (0.8%) (Merck)

60ml TritonX100 (0.8%) (Sigma Aldrich)

60ml A.d.

Wurden zu je 8ml in 15er Falcon aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Nach Bedarf auftauen und je Falcon 1ml FCS und 1ml Ziegen Serum (Sigma Aldrich) hinzugeben

### **m-PBS-Puffer**

Gebrauchslösung 1+9 mit A.d. verdünnen

47,2g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O (Merck)

6.6g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (Merck)

36.0 g NaCl (Merck)

Ad 500ml A.d.

pH zwischen 7.0 und 7.4

### **DAB-Stammlösung (Kit) (Sigma Aldrich)**

Lösung A: 50mg BSA in 25ml A.d. lösen

Lösung B: 250mg DAB in 25ml A.d. lösen

Lösung A und B zu gleichen Teilen gemischt, in Eppendorf Cups aliquotiert (1ml) und bei -20°C gelagert.

### **Ni/Co-Stammlösung**

Lösung A: NiCl<sub>2</sub> 100mg (Sigma Aldrich)

CoCl<sub>2</sub> 5mg (Sigma Aldrich)

H<sub>2</sub>O 5ml

Lösung B: BSA 10mg (Sigma Aldrich)

H<sub>2</sub>O 5ml

Lösung A und B zu gleichen Teilen gemischt, in Cups (240µl pro Cup) aliquotiert und bei -20°C gelagert

### **DAB-Arbeitslösung**

m-PBS (0.1M)	9000µl
DAB Stammlösung	1000µl
Ni/Co Stammlösung	240µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	6µl

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erst kurz vor dem Aufbringen auf den Objektträger hinzufügen.

### **Gelatinelösung**

H <sub>2</sub> O	550ml
Gelatine (Sigma Aldrich)	0,075g
Chromalaun Chrom (III) Kaliumsulfatdecahydrat (Omikron, Neckarwestheim)	0,05g
Glutaraldehyd (Sigma Aldrich)	125µl

### **Phosphatpuffer**

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck)	10,2M
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck)	0,2M

### **DMMB-Lösung (Sigma Aldrich)**

180mg 1,9 Dimethyl-methylen-blue

In 5ml abs. Ethanol lösen

+ 2ml Ameisensäure

+2ml Natriumformat

Ad 1l A.d, pH 3,0

### **AP-Puffer**

1,5 M TRIS, pH 9.0 (Roth)

+1 mM MgCl (Sigma Aldrich)

+1 mM ZnCl (Sigma Aldrich)

### **Substrat**

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

### **Papainpuffer**

0.726 mg/ml 6mM L-Cystein (Sigma Aldrich)

2.234 mg/ml Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma Aldrich)

150 µg/ml Papain (Sigma Aldrich)

Dulbecco's PBS (Sigma Aldrich)

pH 6.0

### **Quant-it PicoGreen dsDNA-Kit (Invitrogen):**

*Substrat PicoGreen (Komponente A)*

*TE-Puffer 20x (Komponente B)*

200mM EDTA

200mM Tris-HCl

1x Puffer hergestellt mit dest. Aqua, pH 7.5

*Lamda-DNA-Standard (Komponente C)*

100 µg/ml in TE gelöst

### **Ureapuffer**

46,46g 6M Urea ad 100ml (Merck)

2,0g 2% SDS ad 100ml (Roth)

In 10 ml SDS/Urea Lösung

1 Tablette Phosphostop (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)

1 Tablette Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche)

**Mops SDS Laufpuffer (20x)**

50 mM MOPS (Roth)

50 mM Tris Base (Roth)

0.1% SDS (Roth)

1mM EDTA (Roth)

pH 7,7

**NuPage Transfer Puffer (20x)**

25 mM Bicine (Roth)

25 mM Bis-Tris (free base) (Roth)

1 mM EDTA (Roth)

pH 7,2

**TBST Waschpuffer (1x)**

25 mM Tris Base (Roth)

150 mM NaCl (Merck)

0.1% TWEEN (Sigma Aldrich)

pH 7,5

**3% BSA-Blockingpuffer**

In 50ml TBST 1,5 g Albumin Fraktion V (Roth) lösen

Vortexen und steril filtrieren

**Milchpulver**

In 50ml TBST Milchpulver (Roth) lösen

Vortexen und steril filtrieren

**SDS-Page Bis – Tris – 4-12% Nupage (1.0mm x 15 well)**

### 3.1.6 Zellen

Es wurden humane mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark (Beckenkamm) dreier männlicher Patienten im Alter zwischen 20 und 40 Jahren verwendet.

### 3.1.7 Zellkultur Medien

#### Proliferationsmedium

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

#### Differenzierungsmedium

##### *Chondrogenes Medium:*

- DMEM high glucose (Gibco Invitrogen)
- + 1% ITS+3 (Sigma Aldrich)
- + 50 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma Aldrich)
- + 40 µg/ml L-Prolin (Sigma Aldrich)
- + 100 nm Dexamethason (Sigma Aldrich)
- + 10 ng/ml TGF-β1 (R&D Systems)
  
- + 10 nM all trans – Retinsäure (Sigma Aldrich)
- + 2 µM BMS439 (Sigma Aldrich)

##### *Hypertrophes Medium:*

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

- + 25 ng/ml BMP4 (R&D Systems)
- + 10 nM all trans – Retinsäure (Sigma Aldrich)
- + 2 µM BMS439 (Sigma Aldrich)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

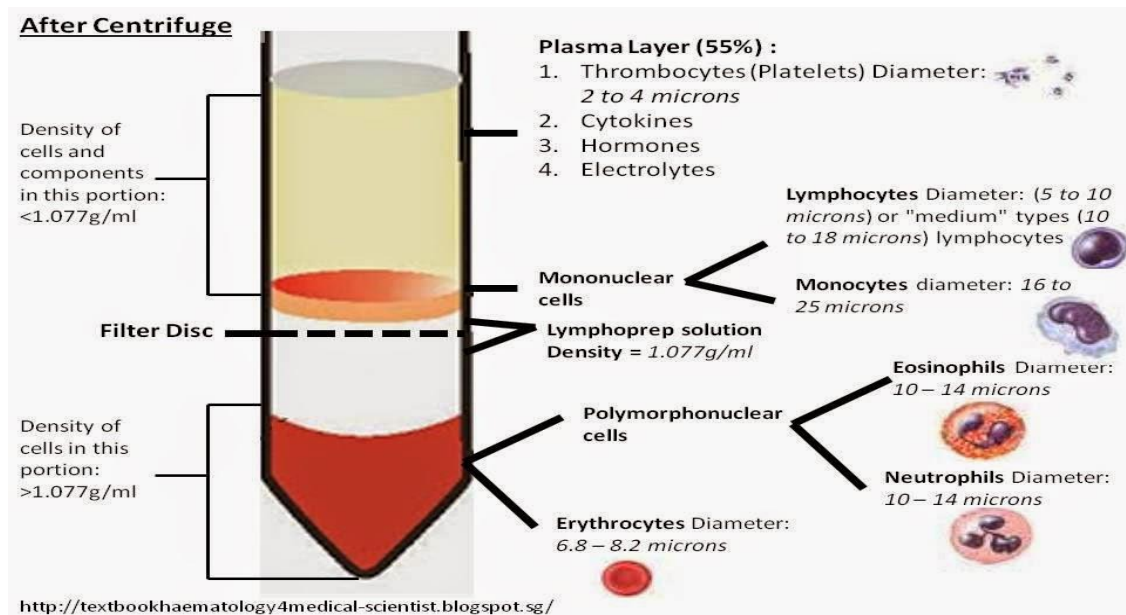
#### **3.2.1.1 Isolierung mesenchymaler Stammzellen**

Für die durchgeführten Experimente wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark dreier männlicher Patienten im Alter zwischen 20 und 40 Jahren verwendet, die ihnen im Rahmen einer Beckenkammoperation zur Zellentnahme entnommen worden waren. Das positive Votum der Ethikkommission sowie die Einverständniserklärung der Patienten lagen zum Zeitpunkt der Entnahme vor.

Für die Isolierung und Aufbereitung der mesenchymalen Zellen wurden diese zunächst in einer verdünnten Heparinlösung zur Gerinnungshemmung bei 4° C gelagert und anschließend mit der Ficoll-Gradienten Methode (Biochrom) aufgereinigt.

Dazu wurde das entnommene Knochenmark in einem Verhältnis 1:5 mit einem Proliferationsmedium gemischt und anschließend über die Ficoll-Lösung (Biochrom) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen aufgebracht. Durch eine 35-minütige Zentrifugation des Falcon-Röhrchens bei 1680 U/min wurden mononukleäre Zellen am Übergang des dünnflüssigen Aspirats zur Ficoll-Lösung gesammelt, während Erythrozyten und reife Granulozyten einen Bodensatz bildeten. Die mononukleäre Zellfraktion, welche die mesenchymalen Zellen (Dichte 1,077 g/ml) enthält, konnte anschließend durch Abpipettieren der milchigen Phase entnommen werden, um sie im frischen Medium zu resuspendieren und erneut für 10 Minuten bei 1000 U/min zu zentrifugieren. Der

Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit frischem Proliferationsmedium vermischt und die Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kryoasserviert.



**Abbildung 8:** PBMC Isolation mit Lymph (Quelle: PBMC Isolation using Lymphoprep 2018)

### 3.2.1.2 Vitalitätstest mit Trypanblau und Zellzählung

7 Cups à 5 Millionen Zellen (P0-Passage, bis 70% Konfluenz vorexpanziert) wurden aufgetaut, sodass sichergestellt war, dass am Ende, trotz Apoptose, die für den Versuch benötigten 27 Millionen Zellen übrigbleiben. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 in Proliferationsmedium aufgenommen. Anschließend wurden 20  $\mu\text{l}$  der resuspendierten Zellen mit 20  $\mu\text{l}$  5%-Trypanblau vermischt. Lediglich abgestorbene und perforierte Zellen nehmen den Farbstoff auf, sodass in der Neubauer- Zählkammer eine prozentuale Bestimmung der Zahl avitaler Zellen möglich war.

Gleichzeitig wurden die lebenden Zellen ausgezählt. Die genaue Zellzahl errechnet sich folgendermaßen:

$\Sigma$  Zellzahl aller Quadrate / 4 = Mittelwert der Zellzahl/Quadrat

Mittelwert der Zellzahl eines Quadrates x  $10^4$  (Kammerfaktor) x 2  
(Verdünnung)= Zellen/ml

Zellen/ml x Volumen der Zellsuspension = Gesamtzellzahl

### 3.2.1.3 Zellexpansion

Pro 75  $cm^3$  Kulturflaschen wurden ca. 300.000 Zellen ausgesät. Die Zellexpansion erfolgte mit 15 ml Proliferationsmedium pro Flasche in einem Brutschrank bei 37°C, 5%  $CO_2$ - Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

Nach einer zweiwöchigen Proliferationsphase erreichten die Zellen eine Konfluenz, wurden abtrypsinisiert und anschließend wurden Pellets angesetzt.

### 3.2.1.4 In vitro-Chondrogenese und Induktion der Hypertrophie

Das Proliferationsmedium wurde aus den Zellkulturflaschen entfernt und der Zellrasen mit sterilem PBS Dulbecco (Sigma Aldrich) gespült. Zum Ablösen der Zellen wurden 3 ml Trypsin/EDTA (Sigma/Aldrich) pro Flasche hinzugefügt und etwa 2-5 Minuten erneut in den Brutschrank gegeben. Das Ablösen wurde mikroskopisch überprüft sowie durch vorsichtiges Beklopfen des Flaschenbodens gefördert. Mit 5 ml Proliferationsmedium wurde die Wirkung des Trypsins abgestoppt, die Zellsuspension in 50er Falcons gesammelt und für 10 Minuten bei 1000 U/min abzentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in ein Differenzierungsmedium ohne Zusätze aufgenommen. Erneut wurde die Zellzahl mit



der Neubauer-Zählkammer bestimmt (s. 1.1.2), bei 1000 U/min abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Für die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen wurde das in-vitro Chondrogenese-Modell, etabliert von Johnstone et. al (1998), verwendet. Hierfür wurde die Zellzahl auf 200.000 Zellen pro 300 µl mit chondrogenem Medium plus Zusätzen (Differenzierungsmedium) eingestellt und in V-Boden 96-Well-Platten (Nalge Nunc Int. Corp., Rochester, NY, USA) ausgesät.

Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 2000 U/min wurden die Platten für 28 Tage bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte bei den nun entstandenen Aggregaten alle 2 Tage.

Für die ersten 14 Tage erfolgte eine Prädifferenzierung mit reinem chondrogenem Differenzierungsmedium, danach wurde bei gewissen Gruppen auf das hypertrophe Differenzierungsmedium umgestellt (s. Tabelle 1).

An Tag 1, Tag 14 und Tag 28 erfolgte die Entnahme von Aggregaten für Histologie, Immunhistochemie und PCR-Messung, sowie von Mediumüberstand für die ALP-Aktivitätsmessung, worauf in den folgenden Kapiteln noch detaillierter eingegangen wird.

## **3.2.2 Histologie und Immunhistochemie**

### **3.2.2.1 Entnahme und Fixierung der Pellets**

Für die histologische und immunhistologische Analyse wurden Aggregate von Tag 14 und Tag 28 verwendet. Das Medium wurde verworfen, die Aggregate wurden für eine Stunde mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert. Nach einer 60minütigen Waschung in 0.1M Phosphatpuffer erfolgte die Inkubation in einer konzentrationsaufsteigenden Saccharose-Reihe (10%,20%,30% in 0,1 M D-(+)-Saccharose (Roth, Karlsruhe) in 0.1M Phosphatpuffer); pro Konzentrationsstufe für mindestens eine Stunde. Zuletzt

wurde die 30%ige Saccharose-Lösung bis auf einen kleinen Überstand entfernt, den Cups (SafeSeal Gefäß) wurden ca. 500 µl Tissue Tek (Sakura, Deutschland) hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Aggregate in reinem Tissue Tek (Sakura, Deutschland) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus den entstandenen Blöcken wurden mithilfe des Microm HM 500 Cryotom (Microm, Deutschland) 10µm dicke Gefrierschnitte auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgetragen.

### **3.2.2.2 DMMB-Färbung**

DMMB (1,9 Dimethyl-Methylen-Blue) ist ein kationischer Farbstoff, der spezifisch an sulfatierte Glykosaminoglykane mit einer Absorption von ca. 525 nm bindet. Er wird zur Quantifizierung unter anderem von Chondroitinsulfaten, Keratin- und Heparinsulfaten verwendet. Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 5 Minuten in Aqua destillatum (A.d.) gestellt, um das restliche Tissue Tek auszuwaschen, und anschließend für 10 Minuten direkt in 0,1%iger DMMB-Lösung inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschen mit A.d. begann die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x 5Min. in 96% Isopropanol, 2x 5Min. in 100% Isopropanol, 2x 10Min. in Xylol), die Präparate wurden mit DePex-Lösung (Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland) eingedeckelt und mikroskopisch untersucht.

### **3.2.2.3 Alkalische-Phosphatase (ALP)-Färbung**

Die Schnitte wurden zunächst für 5 Minuten in  $H_2O$  inkubiert und anschließend mit einem ALP-Färbe-Kit von Sigma angefärbt. Hierfür wurden 1ml Na-Nitrit-Lösung mit 1 ml FBB-Alkaline-Lösung für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 45 ml Miliporewasser, sowie 1ml Naphtol-AS-BI Alkaline Lösung hinzugegeben, die fertige Färbelösung auf die Schnitte pipettiert und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach einem 2minütigen Waschen der Schnitte in A.d. erfolgte

eine Gegenfärbung mit Neutral Red Solution für 2 Minuten, bevor die Schnitte erneut in A.d. gewaschen wurden. Nach kurzem Antrocknen wurden die Schnitte in Karion (Sigma Aldrich) abgedeckt und mikroskopisch untersucht.

#### **3.2.2.4 Immunhistochemie**

Für die immunhistochemische Analyse wurden die Schnitte zunächst für 10 Minuten im Waschpuffer rehydriert, anschließend zur Blockierung der endogenen Peroxidase in 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ Methanol in PBS inkubiert und daraufhin erneut im Waschpuffer gespült.

Für die Immunhistochemie von Collagen I und II wurden die Schnitte 15 Minuten mit der Pepsin-Andaulösung verdaut und daraufhin 3x im Waschpuffer gewaschen.

Für die Immunhistochemie von Collagen X und MMP13 erfolgte zunächst eine 60minütige Inkubation mit 0,2% Hyaluronidase bei 37°C, bevor (nach erneutem Waschen) die Schnitte ebenfalls mit der Pepsin-Andaulösung für 12 Minuten verdaut wurden. Anschließend wurden die Schnitte 3x im Waschpuffer gespült.

Bei allen Schnitten (Collagen I, II, X, MMP13) wurde für 60 Minuten Blockingpuffer hinzugegeben, bevor über Nacht bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte. Lediglich die Negativkontrollen erhielten keinen Primärantikörper.

Am nächsten Tag erfolgte nach einem 3maligen Waschen der Präparate eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte für 90 Minuten mit der ABC-Lösung (welche zuvor für 30 Minuten inkubiert worden war) behandelt, erneut gewaschen und mit DAB entwickelt. Die Schnitte wurden in H<sub>2</sub>O gewaschen, mittels aufsteigender Alkoholreihe (2x 5Min. in 96% Isopropanol, 2x 5Min. in 100% Isopropanol, 2x 10Min. in Xylol) entwässert und abschließend mit Deckglas und DePex abgedeckt.

### **3.2.2.5 Mikroskopie**

Die Bilder der Schnitte wurden mittels folgender Mikroskope untersucht und fotografiert: Nikon Eclipse TE2000-U, Olympus BX 61

### **3.2.3 Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase**

Für die Messung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität wurden jeweils an Tag 14 und Tag 28 auf Eis 150 µl des 2-Tage alten Mediumüberstands entnommen, in eine 96-well-V-Platte überführt und bei 2000 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert. In eine 96-Well-Flachbodenplatte wurden nun 100µl des Überstandes pipettiert und mit 100µl Substratlösung vermischt. Als Nullwert für die Messung fungierte reines DMEM 4,5 g/l High Glucose. Die Messung erfolgte mit dem Microplate Reader Tecan Genios (6Tecan, Männedorf, CH) bei einer Absorption von 405 nm im Kinetik-Intervall von 5 Minuten über eine Messdauer von insgesamt 2 Stunden. Die ALP-Aktivität, welche auf die Transformation von p-nitrophenyl-Phosphat in p-nitrophenol und inorganisches Phosphat zurückzuführen ist, wurde densitrometrisch durch die Absorbanzveränderung bei 405 nm gemessen. Anhand der Steigung der linearen Kurvenanteile ließ sich die enzymatische Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den einzelnen Gruppen errechnen.

### **3.2.4 Glykosaminoglykangehalt und DNA-Bestimmung**

#### **3.2.4.1 Papain-Verdau**

Für die spätere Bestimmung des DNA- und GAG-Gehalts wurde zunächst ein Papain-Verdau durchgeführt.

Die Aggregate von Tag 1, Tag 14 und Tag 28 wurden aufgetaut und die Aggregate von Tag 14 und Tag 28 pro Gruppe zum besseren Verdau auf zwei Cups aufgeteilt. Pro Aggregat wurde 50 µl Papainpuffer hinzugefügt

Als Standardvorhaltung diente Chondroitinsulfat A (40 mg/ml) (Sigma Aldrich), welches ebenfalls mit Papain verdaut wurde. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit 7 Standards hergestellt (80,40,20,10,5,2.5,1 µg/ml; Verdünnung erfolgte mit Papain-Puffer ohne Papain).

Die Aggregate wurden über Nacht bei 60°C inkubiert und anschließend kurz anzentrifugiert.

#### **3.2.4.2 Glykosaminoglykan-Gehalt**

Bevor eine endgültige Bestimmung des GAG-Gehalts möglich war, mussten die Proben zunächst vorverdünnt werden. Die Vorverdünnung erfolgte mit dem Papainpuffer, der bereits zum Verdau verwendet worden war, jedoch ohne Zugabe von Papain. Nach Zugabe einer DMMB-Lösung ließ sich anhand des Farbumschlages von blau nach violett der geeignete Verdünnungsfaktor für jede Probe finden, sodass die Werte alle auf einer Standardkurve lagen. Der jeweils unterschiedliche Verdünnungsfaktor wurde bei der rechnerischen Auswertung beachtet. In einer 96-Well-Flat-Cell Tissue Culture Platte wurden 25 µl jedes Standards bzw. jeder Probenverdünnung vorgelegt, anschließend wurden 200 µl DMMB-Lösung hinzugefügt. Die Messung mit dem Microplate Reader Tecan Genios (Tecan, Männedorf, CH) erfolgte bei 575 nm, als Nullwert diente der Papainpuffer ohne Papain.

### **3.2.4.3 DNA-Bestimmung**

Für die Verdünnungsreihe wurde  $\lambda$ -DNA aus dem Kit linear mit TE-Puffer 1:2 verdünnt, ausgehend von 2  $\mu\text{g/ml}$  Anfangskonzentration.

Die zuvor mit Papainpuffer behandelten Proben wurden 1:15 mit TE-Puffer verdünnt.

In einer 96-WellFlat-Cell Tissue Culture Plate wurden 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Proben mit 100  $\mu\text{l}$  des Substrat PicoGreen, welches vorher 1:200 mit TE-Puffer vorverdünnt wurde, gemischt und kurz inkubiert. Als Nullwert fungierte der reine TE-Puffer. Die Messung erfolgte mit dem Microplate Reader Tecan Genios fluorometrisch, wobei 480 nm als Immission und 520 nm als Emission verwendet wurden.

## **3.2.5 Analyse der Genexpression**

### **3.2.5.1 RNA-Isolierung**

Am Tag 1, Tag 14 und Tag 28 wurden pro Gruppe 10 Aggregate in ein Cup gepoolt. Zur Lyse der Zellen und Inaktivierung der RNasen und anderer Enzyme wurden pro Cup 6 Keramikbeads und 900  $\mu\text{l}$  Quiazol (Qiagen) hinzugefügt, welches Phenol enthält, sodass zusätzlich eine Lösung der RNA gefördert wurde. Die Homogenisierung erfolgte im auf 4°C gekühlten Precelly (Power Gen 1000, Fischer Scientific).

Extraktion und Phasentrennung:

- Überstand in einen neuen Cup überführen; Dissoziation für 30 Min bei Raumtemperatur
- Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  gDNA-Eliminator Solution (Qiagen), 15 Sekunden per Hand schütteln
- Zugabe von 180  $\mu\text{l}$  Chloroform, 15 Sekunden schütteln
- 5 Min Inkubation bei Raumtemperatur
- Zentrifugation bei 12000 U/min für 15 Minuten bei 4°C in der Zentrifuge

In der oberen wässrigen Phase befindet sich nun die RNA, während sich in der unteren Chlorformphase Proteine ansammeln.

RNA-Präzipitation:

- Überführung der wässrigen Phase (ca. 700µl) in ein neues Cup
- Zugabe von 700 µl 70% Ethanol, vorsichtiges Mischen
- Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 Minute bei Raumtemperatur
- 1x Wiederholen

Durch die Matrix aus Kieselgel kommt es zu einer Adsorption der DNA.

Reinigung:

- Zugabe von 700 µl RWT, Zentrifugation bei 80000 U/min für 1 Min
- Der Durchfluss wird verworfen, Zugabe von 500 µl RPE, erneute Zentrifugation bei 8000 U/min für 1Min
- Durchfluss verwerfen, Zugabe von 500 µl RPE, Zentrifugation bei 8000 U/min für 1Min
- Säulchen in ein neues Auffang-Cup stellen und nochmals 2 Minuten zentrifugieren bei 12000 U/min

Hierdurch wurden durch Denaturierung und anschließende Auflösung Proteine entfernt, die an der DNA hingen, während die DNA selbst an der Matrix gebunden bleibt.

Elution:

- Säulchen in neues Eppendorf Cup mit 50 µl DEPC-Wasser eluieren
- 5 Minuten Inkubation
- Zentrifugation bei 12000 U/min für 2 Min

Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit dem Picodrop-Messgerät (Biozym) gemessen.

### 3.2.5.2 cDNA-Synthese

Mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthese Kit (Roche) wurde anschließend 0,5 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Dies geschah in folgenden Schritten:

- 0,5 µg total RNA
- 1 µl anchored oligo(dT) Primer
- Ad 12 µl DEPC-H<sub>2</sub>O
- 10 Min. RNA Denaturierung bei 65°C
- Proben sofort auf Eis und kurz anzentrifugieren

Zugabe von:

- 4 µl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer
- 0,5 µl RNase Inhibitor
- 2 µl dNTP-Mix
- 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase
- Vorsichtig mischen und anzentrifugieren
- Inkubation bei 50°C für 60 Minuten
- Inaktivierung bei 85°C für 5 Minuten, anschließend Reaktion abstoppen auf Eis

Die Proben wurden für weitere Messungen eingefroren.

### 3.2.5.3 Real-Time PCR

Die Genexpressionsanalyse erfolgte mit Hilfe des CFX96 Real Time PCR Detection System (Biorad, Deutschland).

Zunächst wurde aus den Proben eine Arbeitsverdünnung 1:50 mit DEPEC-H<sub>2</sub>O hergestellt.



Zur Herstellung des Standards wurden 5 µl jeder Probe in ein Cup gepoolt und im Verhältnis 1:4 mit DEPEC-H<sub>2</sub>O gemischt. Als Leerwert diente reines DEPEC-H<sub>2</sub>O. Als Housekeeping Gen fungierte PSMB4 (Proteasome subunit beta type-4), auf das die Expression der restlichen Gene mittels der delta-Ct Methode normiert wurde.

Pro Well erfolgte mit dem Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl.

10 µl Sybr Green Mastermix

0,2 µl Primer forward

0,2 µl Primer reverse

4,6 µl H<sub>2</sub>O

+5 µl cDNA Arbeitsverdünnung

Die Proben inklusive des Standards und des reinen DEPEC-H<sub>2</sub>O wurden als Triplikate in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Jede PCR lief mit dem gleichen Programm:

1. Initiale Denaturierung für 10 Minuten bei 90°C
2. 40 Zyklen:
  - Denaturierung bei 95°C für 10 Sekunden
  - Annealing und Elongation bei 60° für 30 Sekunden

### **3.2.6 Protein-Analyse**

#### **3.2.6.1 Western Blot Analyse**

An Tag 1, Tag 14 und Tag 28 erfolgte die Entnahme von 10 Aggregaten pro Gruppe, welche in einem Cup gepoolt, mit PBS gespült und bei -80°C kryoasserviert wurden.

Nach dem Auftauen wurden je Cup 6 silanisierte 2 mm große Keramikbeads sowie 400 µl Ureapuffer hinzugefügt und anschließend homogenisiert (Power Gen 1000, Fischer Scientific). Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die Proben für 4 Stunden bei 4°C in den Rotator gestellt. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 U/min für 5

Minuten wurde der Überstand abgenommen und die Proteinmenge mit Hilfe des Biorad DC-Assay bestimmt.

Für die Proteinbestimmung wurden die Proben 1:2 mit PBS verdünnt. Als Standard diente Albumin aus BSA (2 mg/ml), welches 1:2 mit 6 M Urea/2%SDS gemischt wurde. Für die Standardverdünnungsreihe wurde der Standard, ausgehend von einer Anfangskonzentration von 2 mg/ml, linear im Verhältnis 1:2 weiter verdünnt.

In einer 96-well-Platte wurden je 5 µl des Standards bzw. der Probe vorgelegt und anschließend wurden 25 µl des Reagens A/S (1 ml Reagens A + 20 µl S) plus 200 µl des Reagens B hinzugefügt. Nach einer 15minütigen Inkubationszeit erfolgte die Messung mit Hilfe des Microplate Reader Tecan Genios bei 650nm.

Zur Gelelektrophorese wurde eine SDS-Page Bis-Tris-2-12% Nupage Trägermatrix mit jeweils gleichen Mengen Protein (10µg) beladen und bei 100V für 2h in Proteinbanden aufgetrennt.

Der Proteintransfer erfolgte vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran bei 100V für 2h.

Anschließend wurde die Membran für 15 Minuten im Waschpuffer gewaschen und für eine Stunde mit 3% BSA-Blockingpuffer geblockt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper.

Am nächsten Tag wurde die Membran nach einem dreimaligen 15minütigen Waschvorgang für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert und danach erneut dreimal für je 15 Minuten gewaschen.

Für die Lumineszenz-Detektion wurde das Dura-Kit (Super Signal West Dura Stable Peroxide Buffer + S.S.W.D Enhancer Solution) (Thermo Scientific) verwendet. Mithilfe des ChemiDoc™ MP Imaging System (170-8280) erfolgte die Entwicklung. Für das Strippen wurde Re-Blot Plus Mild Solution (Merck) verwendet; dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Alle Versuchsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

### **3.2.7 Statistische Analyse**

Die Experimente enthalten Material von drei Spendern. Daten der PCR, ALP-Aktivitätsmessung und GAG-Analyse wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung beschrieben. Für die Signifikanz-Analysen wurde der One Way ANOVA-Test in Kombination mit dem Tukey Post-Hoc-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  verwendet.

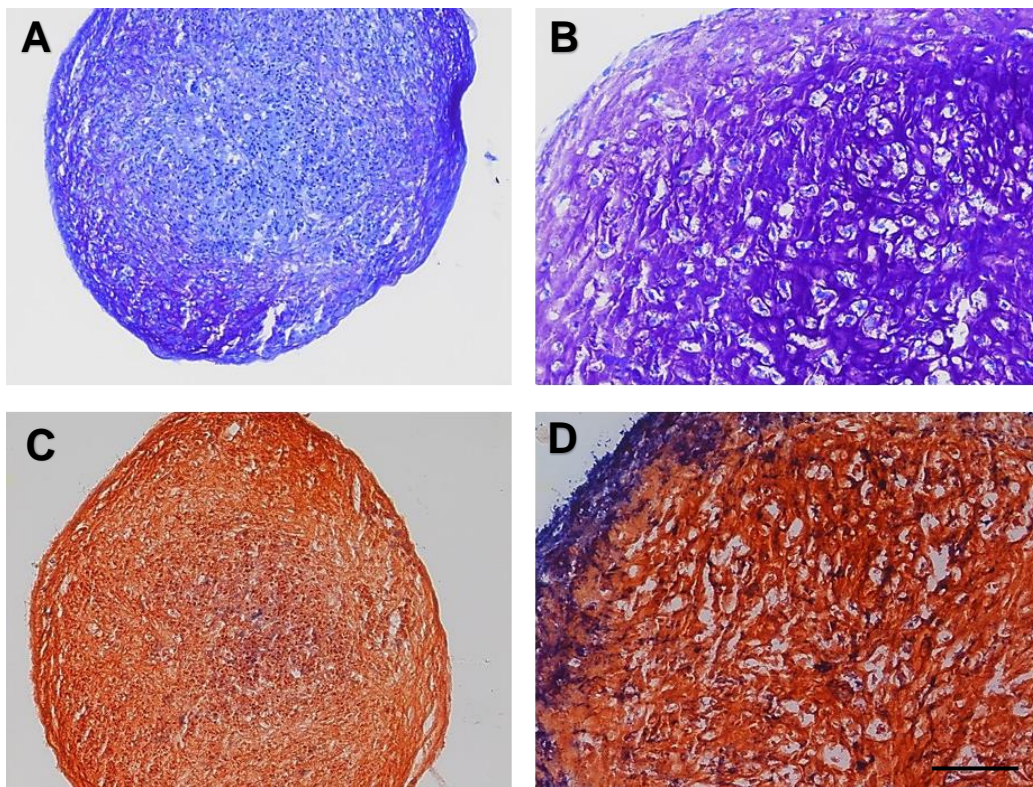
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Charakteristische Differenzierung von hMSC's unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen**

Mithilfe des in vitro-Chondrogenese Modells nach Johnstone et. al (1998) konnte unter entsprechenden Bedingungen ein hypertropher Phänotyp induziert werden. Die chondrogenen und hypertrophen Konditionen lassen sich histologisch und auf Genexpressionsebene gut miteinander vergleichen.

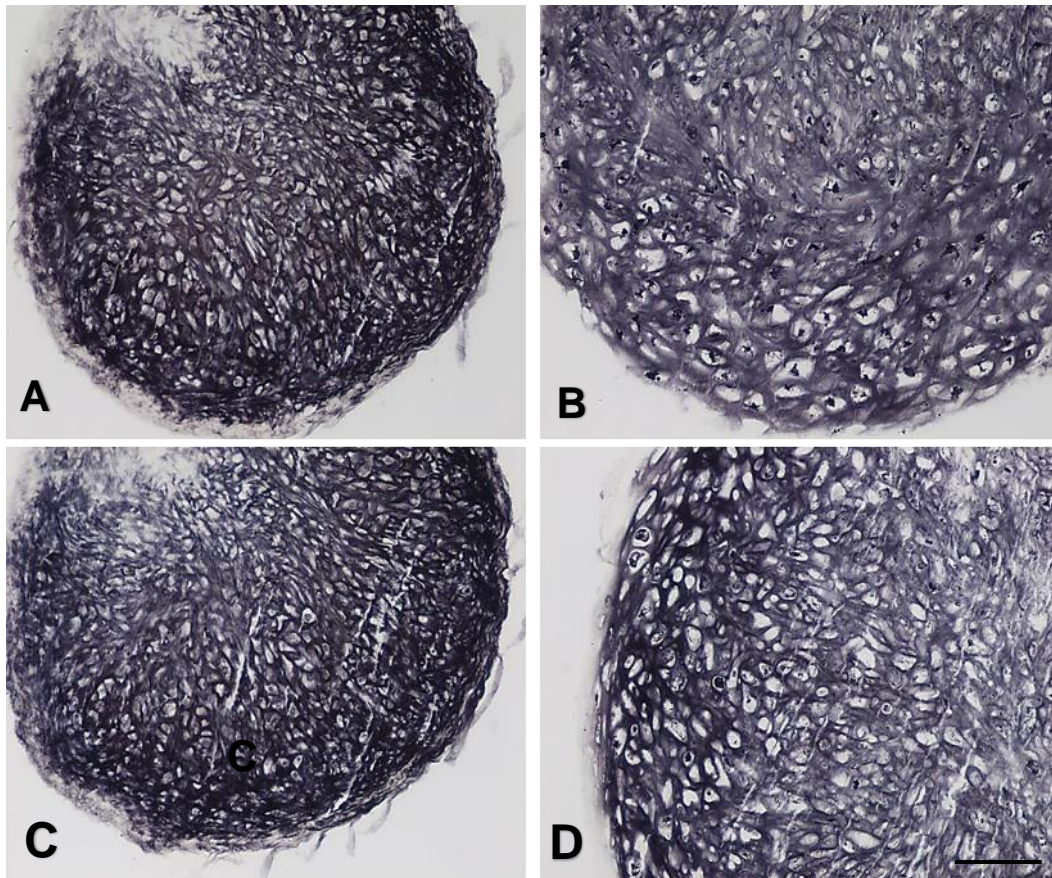
#### **4.1.1 Histologische Analyse**

Unter Zugabe von BMP4 und Entzug von Dexamethason und TGF- $\beta$ , konnte, im Vergleich zu Kontrollaggregaten, die kontinuierlich 28 Tage lang chondrogenes Medium erhielten, ein hypertropher Phänotyp gebildet werden. Nach 28 Tagen zeigten die hypertrophierten Aggregate die typischen hypertrophen morphologischen Kennzeichen mit vergrößerten Zellvolumen und Zelllakunen. Die chondrogen differenzierten Kontrollaggregate zeigten dagegen kaum Anzeichen einer Zellhypertrophie, sondern ähnelten stattdessen hyalinem Knorpel. In der DMMB-Färbung zeigten die hypertrophen Aggregate eine stärkere Differenzierung mit einer ausgeprägten chondrogenen Matrixanfärbung (Abb. 9 B). In der ALP-Färbung waren unter hypertrophen Bedingungen über das ganze Aggregat verteilt ALP-positive blaue Zellen vorhanden (Abb. 9 D), während sich diese nur in einer geringen Anzahl und im Zentrum der chondrogenen Zellaggregate nachweisen ließen (Abb. 9 C).



**Abbildung 9:** Histologisches Erscheinungsbild der MSC's Pellets (10-fache Vergrößerung) am Tag 28 unter chondrogenen (A, C) und hypertrophen (B, D) Bedingungen. **A, B** DMMB-Färbung. **C, D** Alkalische Phosphatase-Färbung (blau) mit Neutralrot als Gegenfärbung. Der hypertrophe Phänotyp mit vergrößertem Zellvolumen sowie die ALP-Aktivität sind unter hypertrophen Bedingungen (B, D) stärker vorhanden als unter chondrogenen Bedingungen (A, C). Maßstab = 200µm.

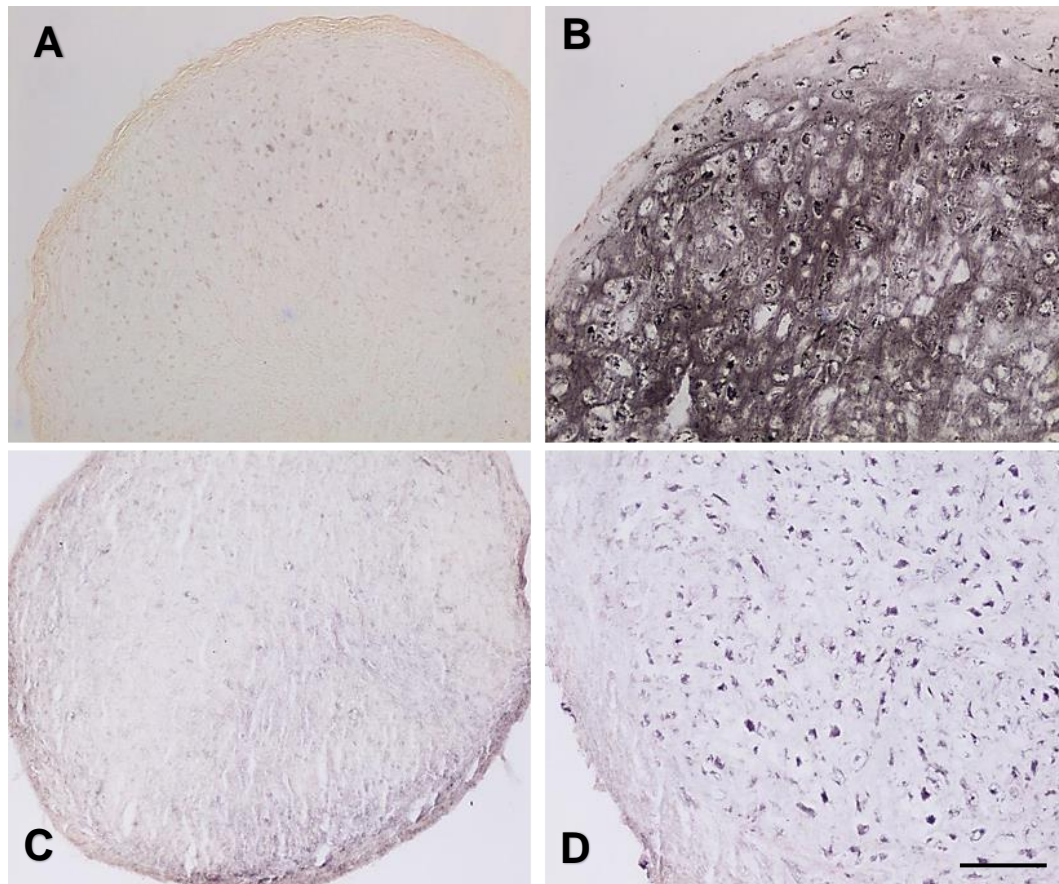
Kollagen I- und Kollagen II- Färbung waren sowohl in den chondrogenen, als auch in den hypertrophen Aggregaten stark vorhanden (Abb. 10).



**Abbildung 10:** Histologisches Erscheinungsbild der MSC's Pellets (10-fache Vergrößerung) am Tag 28 unter chondrogenen (A, C) und hypertrophen (B, D) Bedingungen. **A, B** Kollagen I. **C, D** Kollagen II. Maßstab = 200µm.

Im Gegensatz dazu kam es bei den immunhistochemischen Färbungen für Kollagen X (Abb. 11) und MMP13 (Abb. 11) zu deutlichen Unterschieden. Während die hypertrophen Aggregate vermehrt Kollagen X und MMP13 (Abb. 11 B, D), beides typische Hypertrophie-Marker, exprimierten, waren diese Marker nur sehr schwach in den chondrogenen Aggregaten (Abb. 11 A, C) vorhanden.





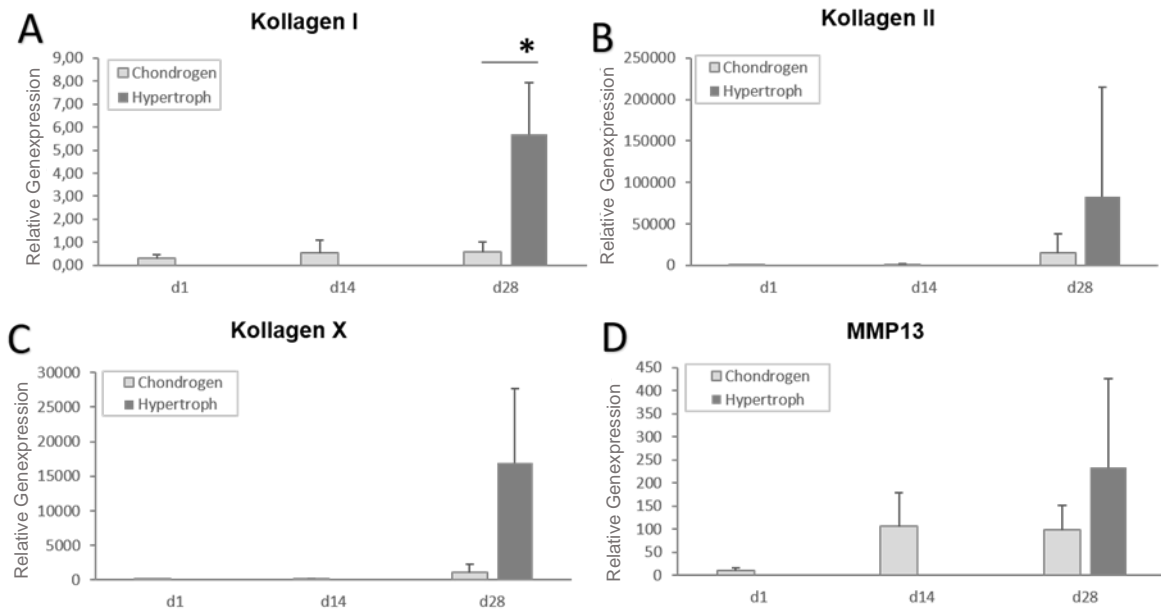
**Abbildung 11:** Histologisches Erscheinungsbild der MSC's Pellets (10-fache Vergrößerung) am Tag 28 unter chondrogenen (A, C) und hypertrophen (B, D) Bedingungen. **A, B** Kollagen X. **C, D** MMP13. Vermehrte Anfärbung von sowohl Kollagen X als auch MMP13 unter hypertrophen Bedingungen (B, C) im Vergleich zu den chondrogenen Kontrollgruppen (A, C). Maßstab = 200µm.

#### 4.1.2 Genexpressions-Analyse

Zusätzlich zur Histologie wurde die Genexpression von Kollagen I, II, X, MMP13 (Abb. 12), sowie der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9 (Abb. 13) bei den chondrogenen und hypertrophen Aggregaten untersucht.

Auch hier ließen sich die zuvor histologisch analysierten Ergebnisse bestätigen. Insgesamt war bei den chondrogenen Aggregaten eine schwache Zunahme von Kollagen I und Kollagen II über den Untersuchungszeitraum erkennbar. Während am Tag 28 jedoch histologisch für Kollagen I und Kollagen II kein deutlicher Unterschied

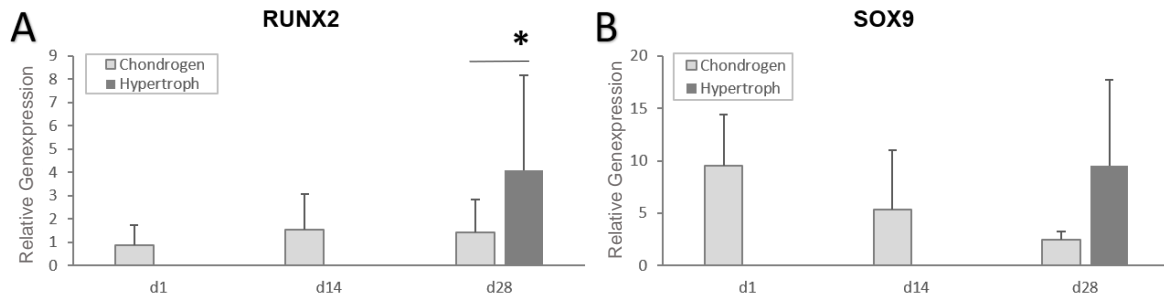
feststellbar war zwischen chondrogenen und hypertrophen Bedingungen, zeigte sich in der real-time-PCR-Analyse für Kollagen I ein 5-facher, statistisch signifikanter und für Kollagen II ein 2-facher Anstieg, hier jedoch ohne statistische Signifikanz. Für Kollagen X und MMP13 zeigten die hypertrophen Aggregate ebenfalls eine Zunahme im Vergleich zu den chondrogenen Kontrollgruppen.



**Abbildung 12:** Genexpressionsanalyse mithilfe real-time-PCR von Kollagen I, II, X und MMP13, normalisiert zu Tag (d) 0 unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen am Tag (d) 28; Referenz-Gen: PSMB4 (Proteasome subunit beta type-4); N=3. Anstieg der Kollagen I, II, X, sowie der MMP13 Expression im Laufe der Zeit; verstärkte Expression in hypertrophen Gruppen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen hypertrophen und chondrogenen Gruppen (A-D), \* $p \leq 0.05$

Zuletzt erfolgte auch die Analyse der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9, beides entscheidende Faktoren im TGF- $\beta$ -Signalweg. Hier exprimierten insbesondere die hypertrophen Aggregate RUNX2 mit einem signifikanten Unterschied zur chondrogenen Kontrollgruppe am Tag 28. In den chondrogenen Gruppen lässt sich im Verlauf der 28 tägigen Kulturzeit eine stetige Abnahme der Sox9 Expression feststellen.

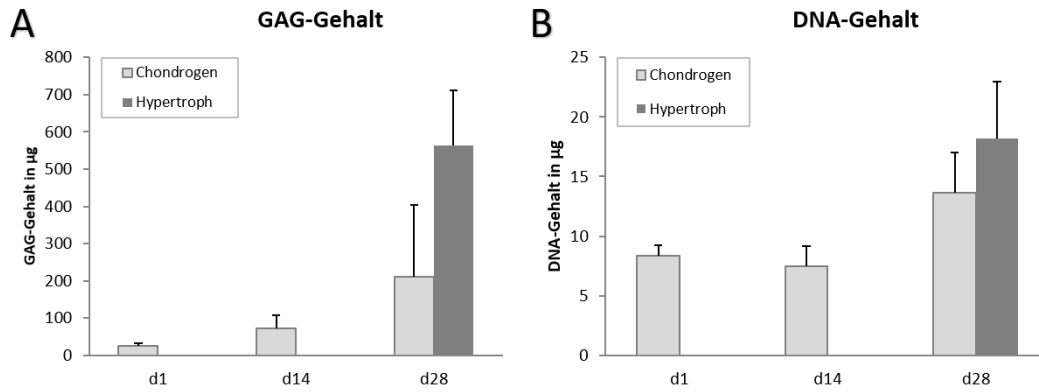




**Abbildung 13:** Genexpressionsanalyse mittels real-time-PCR von RUNX2 und SOX9, normalisiert zu Tag 0 unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen am Tag 28; Referenzgen PSMB4; N=3. Signifikante Verstärkung der Expression von RUNX2 in den hypertrophen Gruppen im Vergleich zu den chondrogenen Kontrollgruppen, \* $p \leq 0.05$ . Verminderte Expression von SOX9 im Laufe der Zeit in den chondrogenen Gruppen; kein signifikanter Unterschied zwischen hypertrophen und chondrogenen Aggregaten.

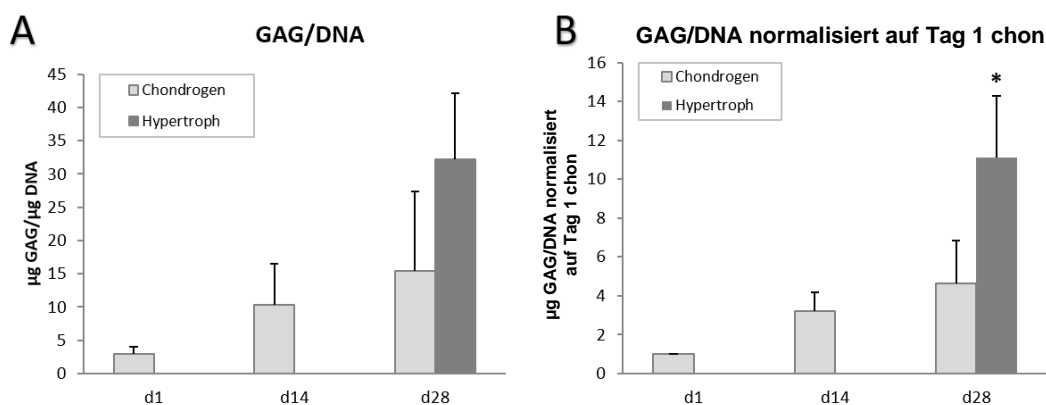
#### 4.1.3 Glykosaminoglykan-(GAG)gehalt und DNA-Bestimmung

Mit Hilfe der DNA-Konzentration ließ sich die Zellproliferation an Tag 1, 14 und 28 für die chondrogenen Kontrollgruppen, sowie an Tag 28 für die hypertrophe Gruppe bestimmen. In den chondrogenen Aggregaten nahm die DNA-Konzentration bis Tag 14 leicht ab, stieg aber in der zweiten Hälfte bis Tag 28 an. Am Ende der 4-wöchigen Differenzierungsphase ließ sich keine Regelmäßigkeit beim direkten Vergleich der hypertrophen mit der chondrogenen Bedingung erkennen (Abb. 14 B). Der Glykosaminoglykangehalt stieg in den chondrogenen Gruppen über den gesamten Zeitraum an. An Tag 28 lag der GAG-Gehalt unter hypertrophen Bedingungen höher als unter chondrogenen Bedingungen, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 14 A).



**Abbildung 14: A** DNA-Gehalt und **B** GAG-Gehalt pro Matrix in µg an Tag 1,14 und 28 unter hypertrophen und chondrogenen Bedingungen; N=3.

Um zu überprüfen, ob der vermehrte GAG-Gehalt nicht nur der Zunahme an Zellen geschuldet ist, wurde aus den Mittelwerten der drei Proben das Verhältnis von GAG-Gehalt zu DNA-Konzentration pro Matrix errechnet. Das Ergebnis ähnelt dem reinen GAG-Gehalt, sodass eine Zunahme über die gesamten 4 Wochen in den chondrogenen Aggregaten anzunehmen ist. An Tag 28 ist nach wie vor bei der hypertrophen Gruppe die stärkste Konzentration an Glykosaminoglykanen zu verzeichnen, jedoch ohne signifikanten Unterschied (Abb. 15 A). Normalisiert man jedoch die Werte zur chondrogenen Kontrolle an Tag 1, so liegt ein signifikanter Unterschied zwischen der hypertrophen Gruppe und der chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 28 vor (Abb. 15 B).



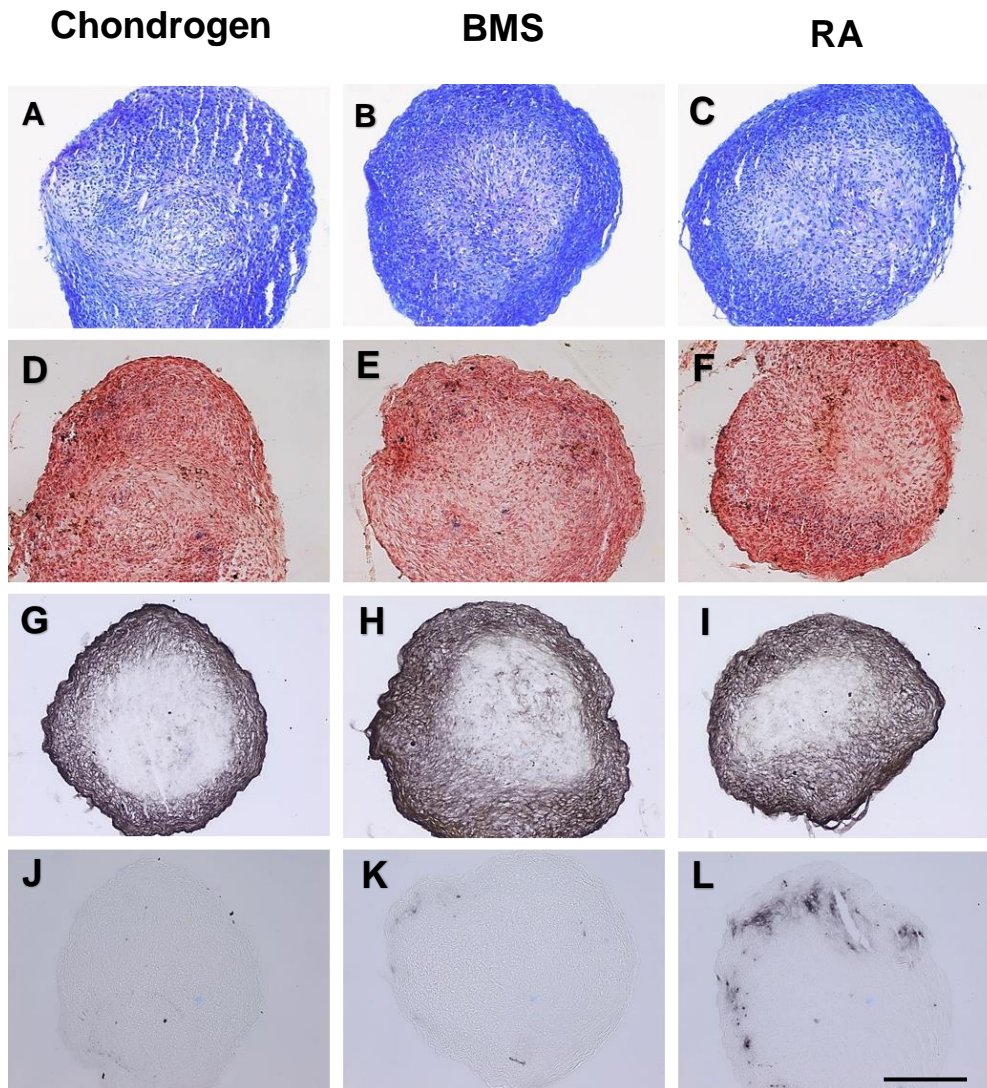
**Abbildung 15: A** GAG-DNA-Verhältnis an den jeweiligen Entnahmetagen und **B** GAG-DNA-Verhältnis, normalisiert zur chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 1; N=3

## **4.2 Chondrogene Differenzierung unter Einfluss von BMS493 und RA**

14 Tage lang erhielten drei Gruppen reines chondrogenes Medium, eine Gruppe ohne zusätzliche Faktoren, und je eine Gruppe zusätzlich mit BMS493 (2 $\mu$ M) und RA (10nM). Ab Tag 14 erhielten die Zellen bis zum Ende der Kulturzeit (d28) reines chondrogenes Medium ohne Zusatz von BMS493 oder RA. Im Folgenden soll der Einfluss von RA und BMS493 auf die chondrogene Differenzierung untersucht werden.

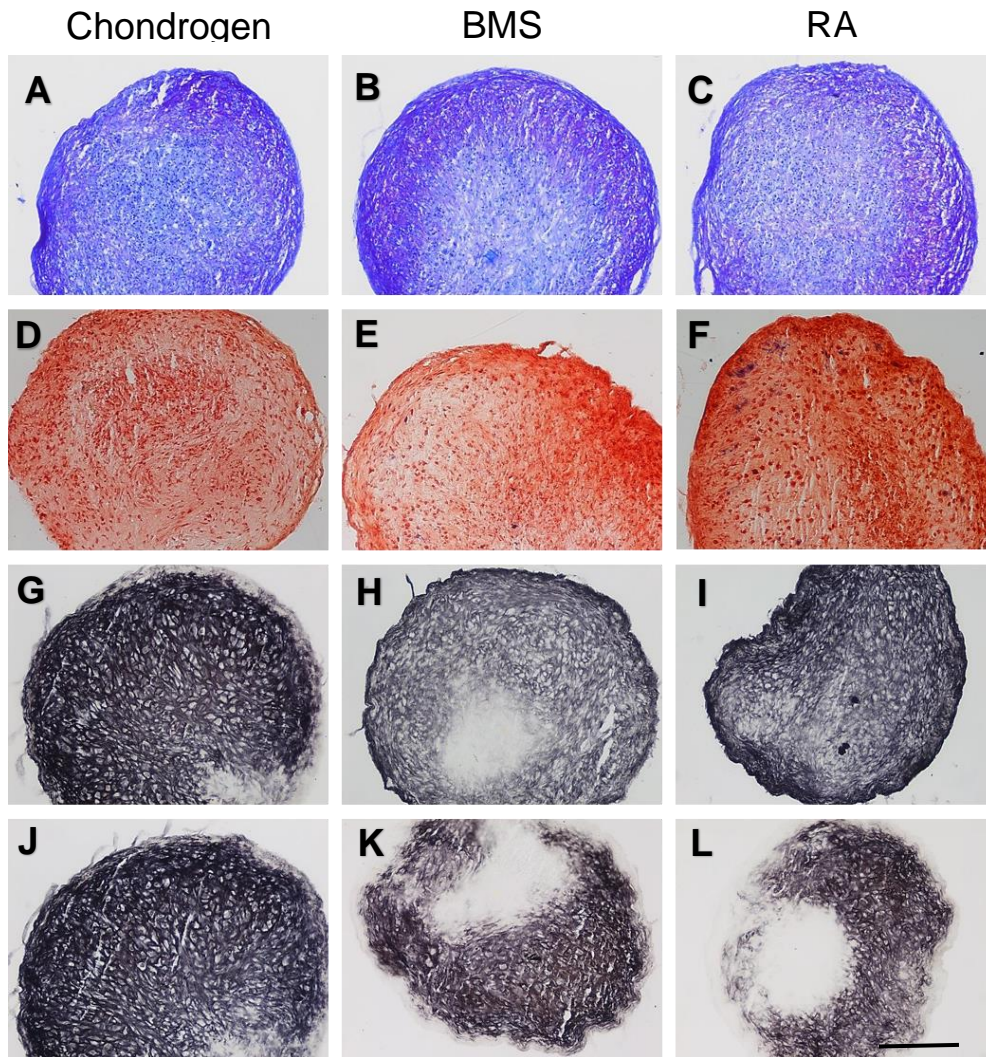
### **4.2.1 Histologische Analyse**

An Tag 14 ließen sich histologisch keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennen. Überall zeigte sich in der DMMB-Färbung noch ein schwach ausgeprägter chondrogener Phänotyp. Während Kollagen II noch kaum nachweisbar war, zeigte sich Kollagen I vornehmlich im Randbereich der Zellaggregate. In der ALP-Färbung waren nur vereinzelt ALP-positive Zellen (blau angefärbt) erkennbar (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Aggregate an Tag 14 (10-fache Vergrößerung) unter chondrogenen (A, D, G, J), chondrogenen+BMS (BMS: B, E, H, K) und chondrogenen+RA (RA: C, F, I, L) Bedingungen. **A, B, C** DMMB-Färbung. **D, E, F** ALP-Färbung. **G, H, I** Kollagen I-Färbung, **J, K, L** Kollagen II-Färbung. Maßstab =200µm.

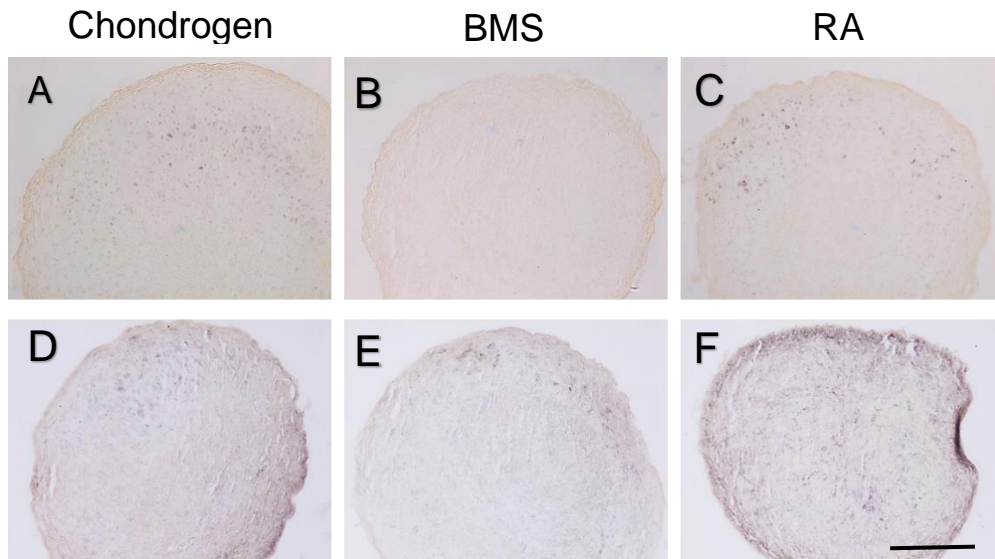
Auch an Tag 28 ließen sich kaum Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Alle Zellaggregate waren mittelgroß, zeigten eine bessere chondrogene Differenzierung als an Tag 14, jedoch nach wie vor deutlich schwächer im Vergleich zu den hypertrophen Vergleichsgruppen (s. 4.3.1). In den Kollagen I- und II-Färbungen zeigte die chondrogene Kontrollgruppe eine etwas stärkere Anfärbung als die mit BMS493 bzw. RA behandelten chondrogenen Gruppen. Alle Gruppen wiesen in der ALP-Färbung (Abb.17 D, E, F) nur ein geringes Staining auf.



**Abbildung 17:** Aggregate an Tag 28 (10-fache Vergrößerung) unter chondrogenen (A, D, G, J), chondrogenen+BMS (BMS: B, E, H, K) und chondrogenen+RA (RA: C, F, I, L) Bedingungen. **A, B, C** DMMB-Färbung. **D, E, F** ALP-Färbung. **G, H, I** Kollagen I-Färbung, **J, K, L** Kollagen II-Färbung. Maßstab = 200µm.

Auch in der Kollagen X und MMP13- Färbung zeigte sich in allen Gruppen nur eine geringe Anfärbung (Abb.18). Allerdings fiel auf, dass sowohl Kollagen X als auch MMP13 am schwächsten in der chondrogenen Gruppe mit BMS493 vertreten waren (Abb.18 B, E).

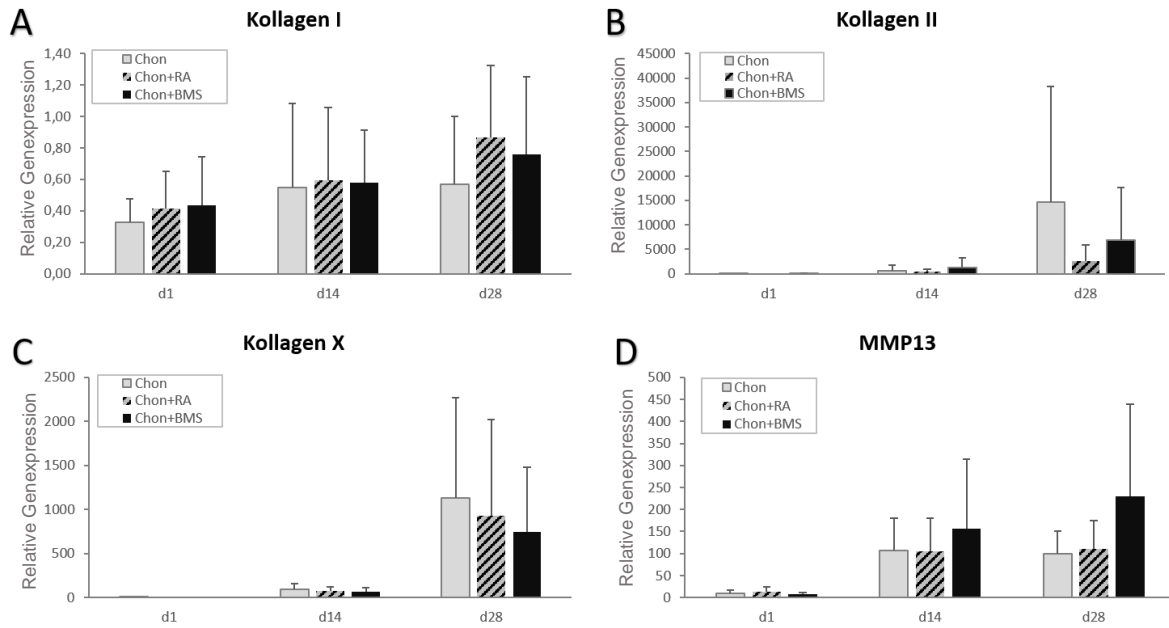




**Abbildung 18:** Aggregate (10-fache Vergrößerung) an Tag 28 unter chondrogenen (A, D), chondrogenen+BMS (BMS: B, E) und chondrogenen+RA (RA: C, F) Bedingungen. **A, B, C** Kollagen X-Färbung. **D, E, F** MMP13-Färbung. Maßstab = 200µm.

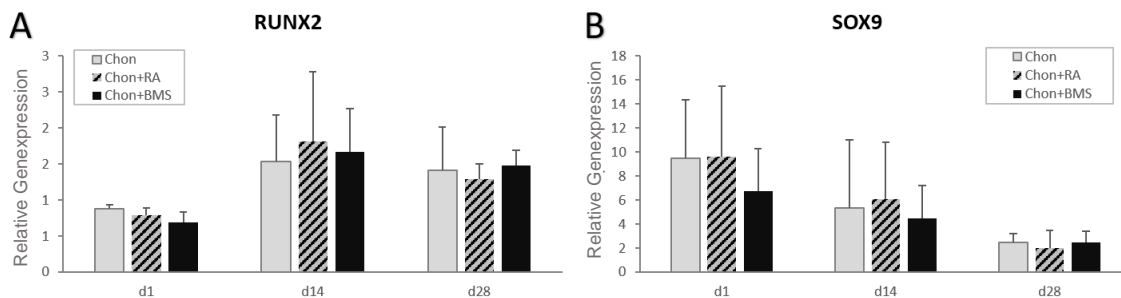
#### 4.2.2 Genexpressions-Analyse

Auf Gen-Ebene ließen sich weder an Tag 1 noch an Tag 14 und Tag 28 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Innerhalb der Gruppen zeigten sich jedoch Unterschiede im Laufe der 28-tägigen Differenzierungsphase. Insbesondere die Expression von Kollagen II und X (Abb. 19) stieg in der zweiten Hälfte der Kulturzeit stark an. Die Expression von MMP13 (Abb.19) nahm hingegen nur bis Tag 14 zu und blieb in der zweiten Differenzierungshälfte weitestgehend konstant.



**Abbildung 19:** Genexpressionsanalyse mithilfe real time PCR von Kollagen I, II, X und MMP13, normalisiert zu PSMB4 (Proteasome subunit beta type-4) unter jeweiligen Bedingungen am Tag 1, 14 und 28; N=3

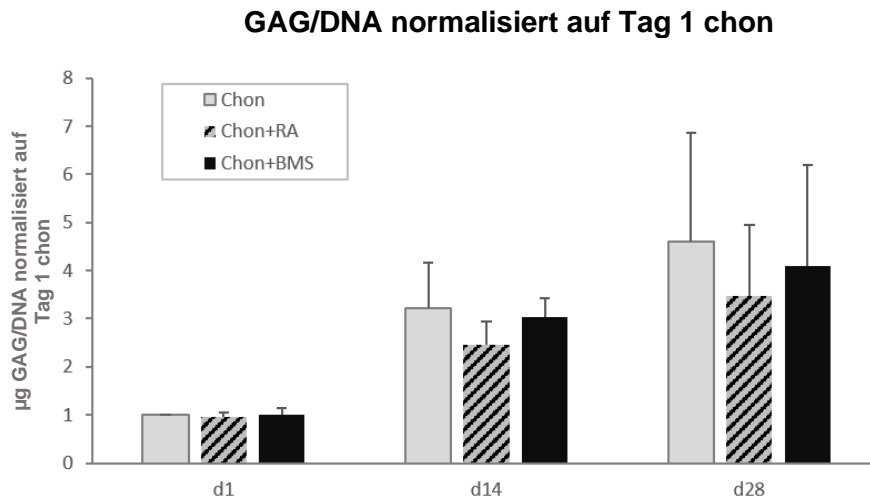
Der Transkriptionsfaktor SOX9 (Abb. 20) wurde insbesondere am Anfang der Chondrogenese an Tag 1 exprimiert, nachdem die Zellen aus der Proliferationsphase in den Aggregatzustand gebracht worden waren. Im Verlauf der 28 Tage sank seine Expression gleichmäßig.



**Abbildung 20:** Genexpressionsanalyse mittels real time PCR von RUNX2 und SOX9, normalisiert zu PSMB4 unter entsprechenden Bedingungen an Tag 1, 14 und 28; N=3.

### 4.2.3 Glykosaminoglykan-(GAG)gehalt und DNA-Bestimmung

Über den 28-tägigen Differenzierungszeitraum hinweg ließ sich eine Zunahme des GAG-Gehalts in allen drei Gruppen feststellen, wobei insgesamt die chondrogene Kontrollgruppe den höchsten GAG-Gehalt aufwies. Zwischen den Gruppen selbst hingegen zeigten sich keine relevanten Unterschiede.



**Abbildung 21:** GAG-DNA-Verhältnis an den jeweiligen Entnahmetagen normalisiert zur chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 1; N=3.

### 4.3 Einfluss des Retinsäure-Signalwegs auf Induktion bzw. Hemmung der Hypertrophie in chondrogen differenzierten hMSC's

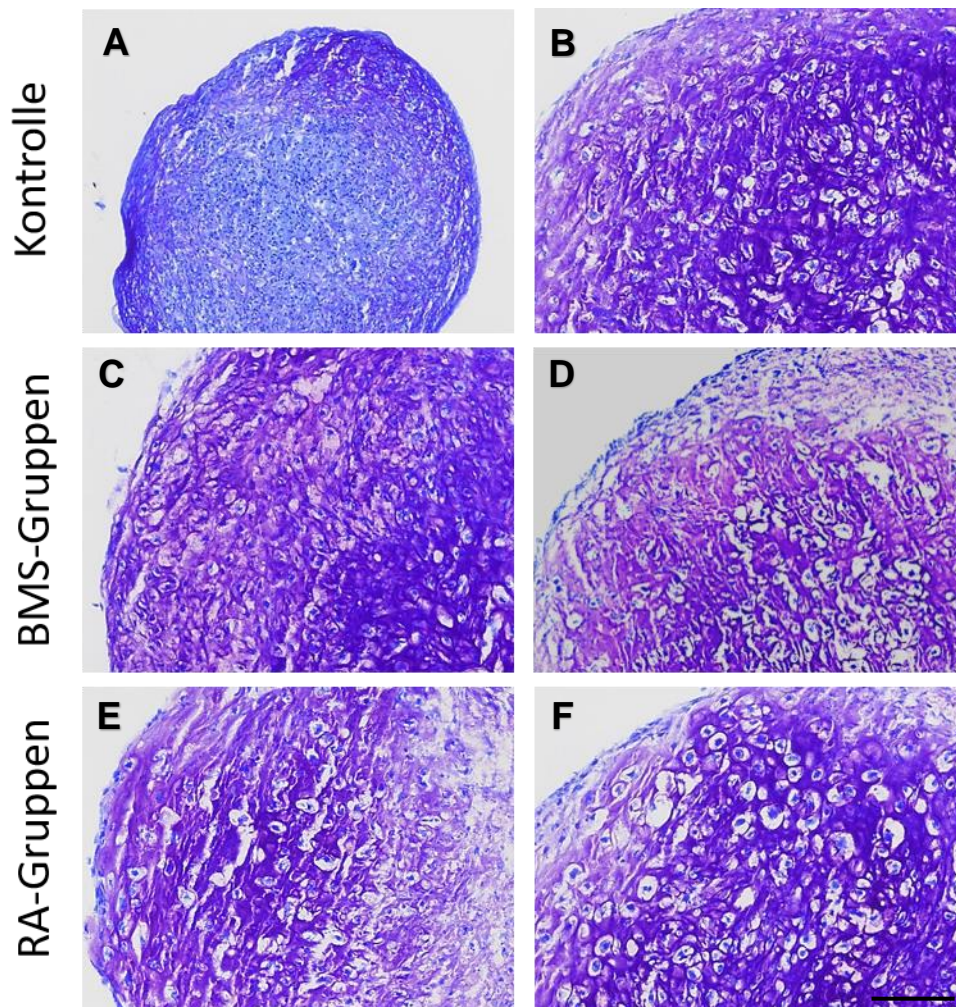
Die erfolgreiche Induktion einer Hypertrophie mithilfe des in vitro-Chondrogenese-Modells nach Johnstone et. al (1998) wurde bereits gezeigt. Nun sollte jedoch untersucht werden, welchen Einfluss ein Retinsäurerezeptor-Antagonist und -Agonist auf die Hypertrophie von chondrogen differenzierten hMSC's ausübt. Hierfür wurden die hypertrophen Gruppen an Tag 28 miteinander verglichen. Insbesondere sollte



auch untersucht werden, welche Relevanz dem Zeitpunkt der Behandlung mit einem Retinsäurerezeptor-Agonisten/-Antagonisten zukommt.

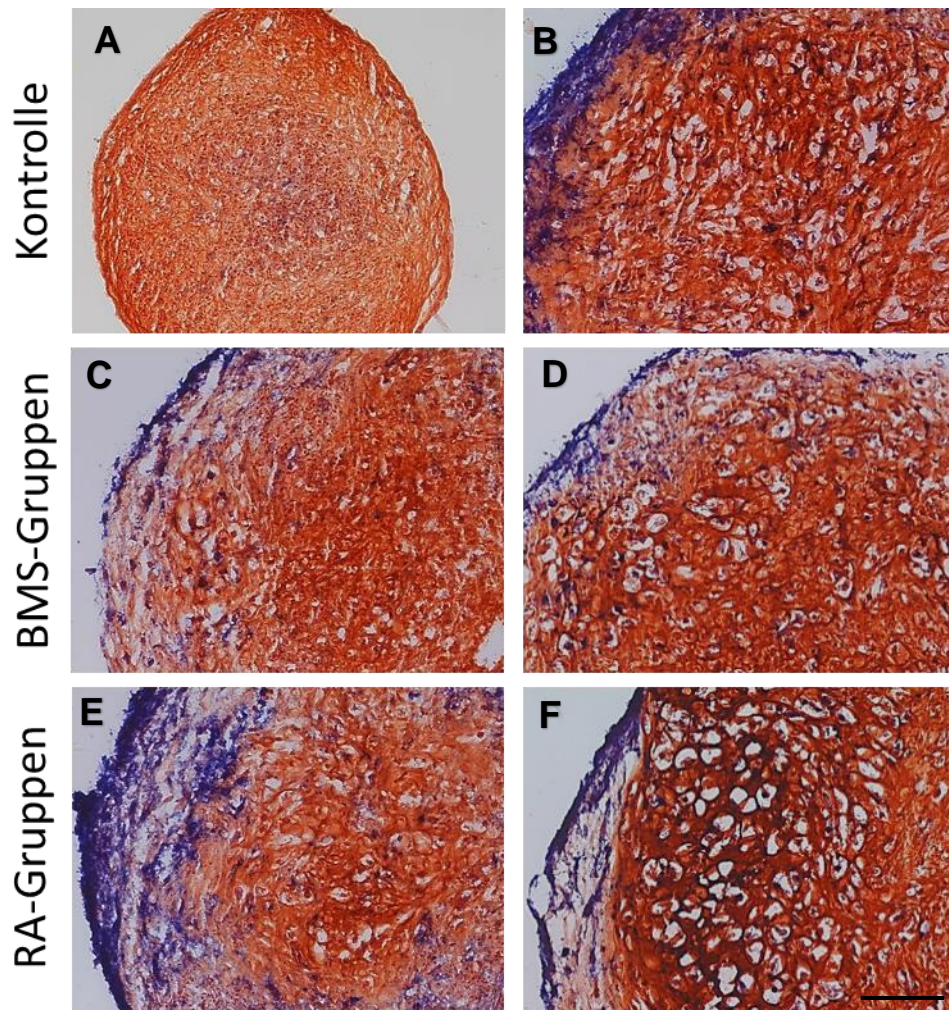
### **4.3.1 Histologische Analyse**

Durch die Zugabe von BMP4 und den Entzug von TGF- $\beta$  sowie Dexamethason entstand ein hypertropher Phänotyp, sowohl in den mit RA als auch in den mit BMS493 behandelten Gruppen. In der DMMB-Färbung wie auch in der Kollagen II-Färbung war erkennbar, dass durch die Differenzierung mit BMP4 eine stärkere chondrogene Matrix gebildet worden war. In der DMMB-Färbung konnten in den hypertrophen Gruppen im Vergleich zur chondrogenen Vergleichsgruppe vermehrt sulfatierte Glykosaminoglykane, wie Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat, gefunden werden. In allen hypertrophen Gruppen ließen sich hypertrophe Zellen mit vergrößertem Zellvolumen und Zelllakunen darstellen, wobei jedoch bereits auffiel, dass in der Gruppe mit der frühen BMS493-Behandlung (Abb. 22 C) weniger hypertrophe Zellen vorhanden waren als in der hypertrophen Kontrollgruppe.



**Abbildung 22:** DMMB-Färbung (10-fache Vergrößerung) am Tag 28 unter jeweiligen Bedingungen. **A** Chondrogene Kontrollgruppe. **B** Hypertrophe Kontrollgruppe. **C** Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). **D** Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). **E** Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). **F** Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.

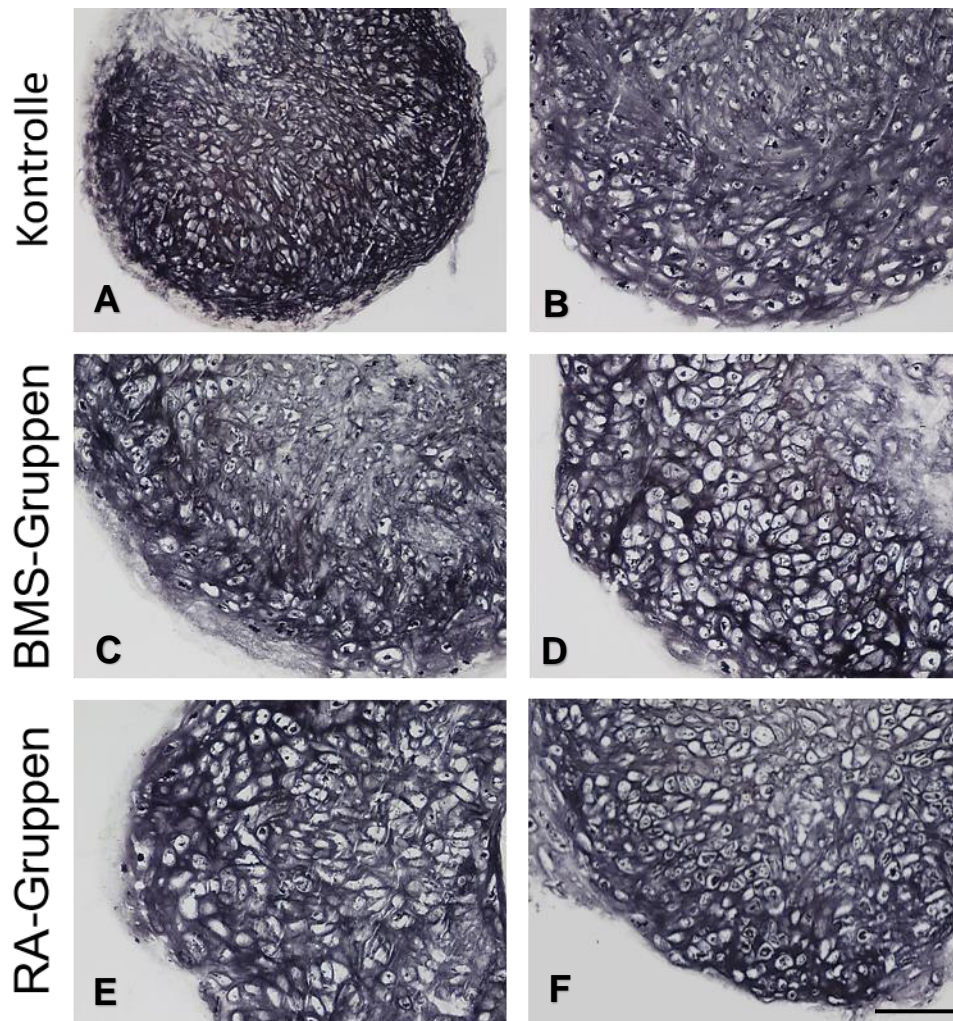
In allen hypertrophen Gruppen ließen sich vermehrt Alkalische Phosphatase nachweisen, vorzugsweise an den Zellrändern. Insbesondere die RA-Gruppen (Abb. 23 E, F) exprimierten verstärkt alkalische Phosphatase. Dem gegenüber fiel die Färbung in der Gruppe mit der frühen BMS493-Behandlung (Abb.23 C) unter allen hypertrophen Gruppen am schwächsten aus.



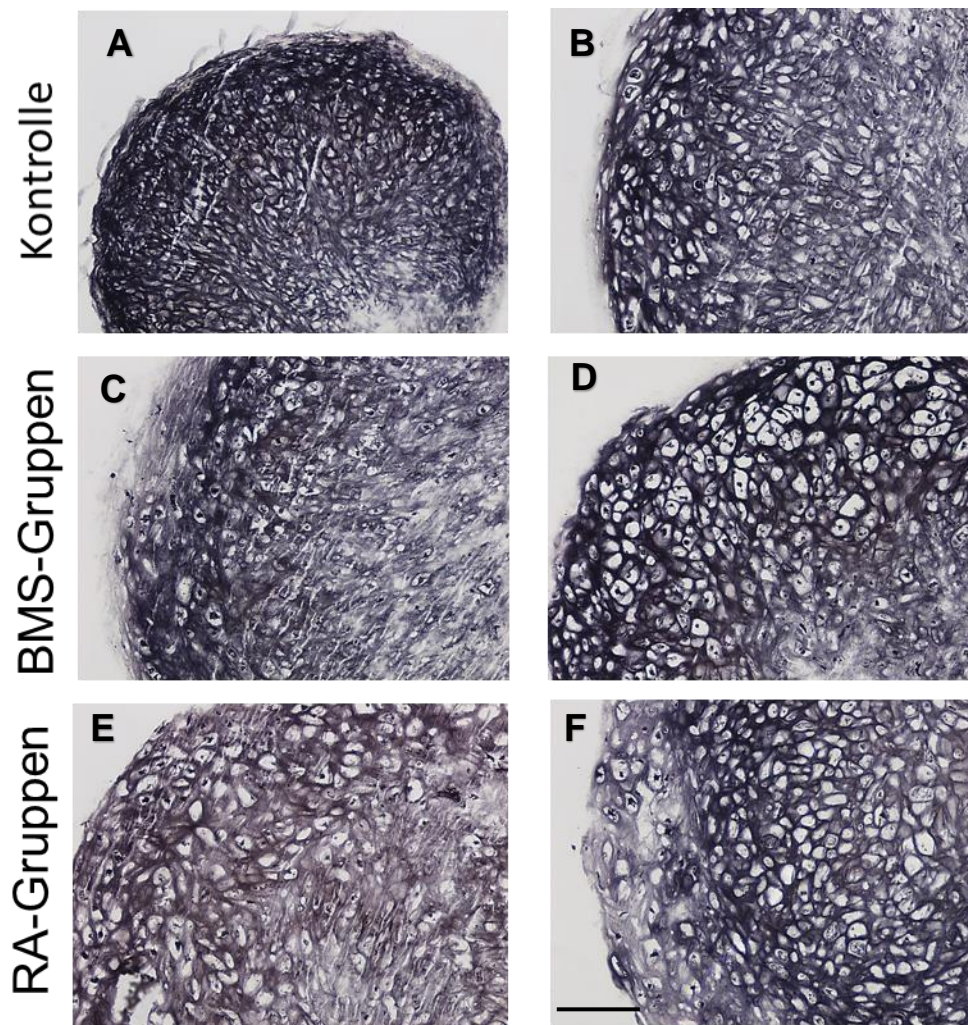
**Abbildung 23:** Alkalische-Phosphatase-Färbung am Tag 28 (10-fache Vergrößerung); Gegenfärbung: Neutralrot. **A** Chondrogene Kontrollgruppe. **B** Hypertrophe Kontrollgruppe. **C** Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). **D** Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). **E** Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). **F** Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.

Bei den immunhistochemischen Färbungen von Kollagen I und Kollagen II fielen die Unterschiede zwischen den Gruppen schwächer aus. Kollagen I war am Tag 28 genauso stark vorhanden wie Kollagen II. Im Vergleich zu den chondrogenen Kontrollgruppen traten bei den hypertrophen Aggregaten Kollagen I und II gleichmäßig im ganzen Aggregat auf. Innerhalb der Gruppen war bei beiden Färbungen die Gruppe mit der späten BMS493-Behandlung (Abb. 24 D, Abb.25 D) mit am stärksten angefärbt, die Unterschiede insgesamt waren jedoch gering.





**Abbildung 24:** Kollagen I-Färbung (10-fache Vergrößerung), Tag 28 mit jeweiligen Bedingungen. **A** Chondrogene Kontrollgruppe. **B** Hypertrophe Kontrollgruppe. **C** Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). **D** Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). **E** Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). **F** Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.

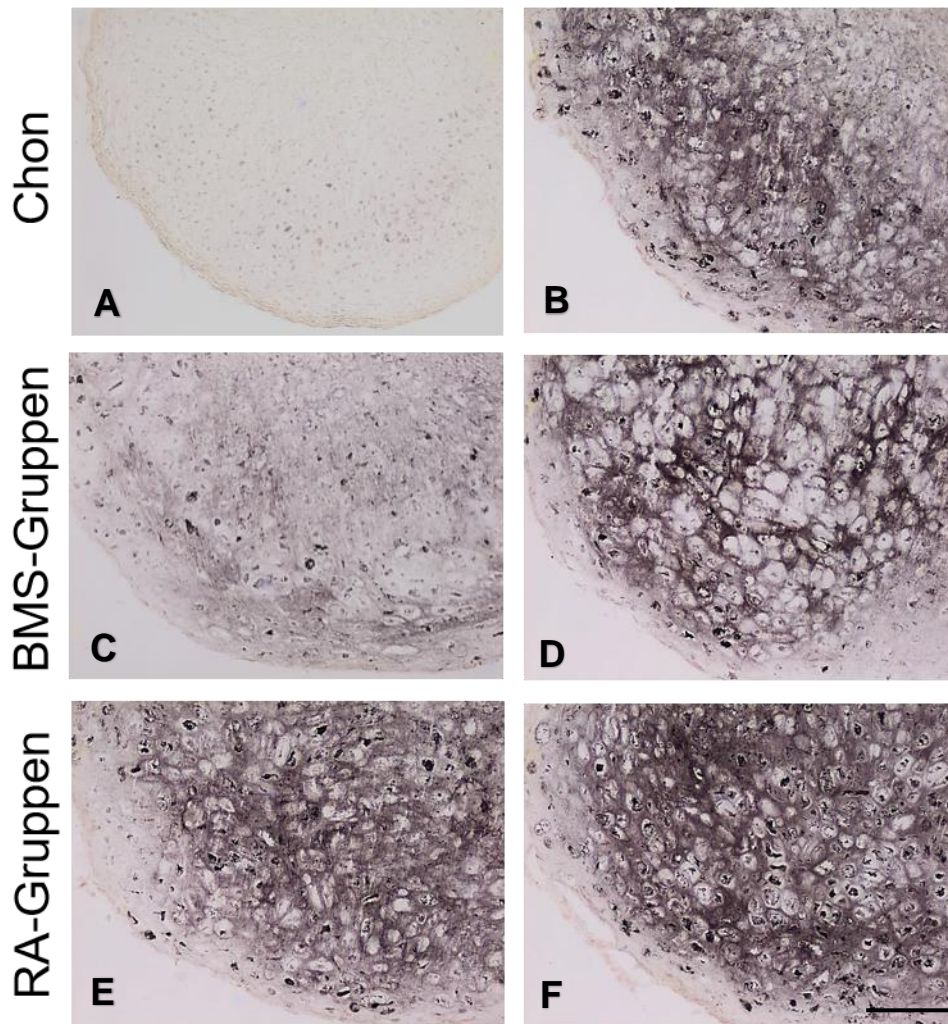


**Abbildung 25:** Kollagen II-Färbung (10-fache Vergrößerung) mit jeweiligen Bedingungen am Tag 28. **A** Chondrogene Kontrollgruppe. **B** Hypertrophe Kontrollgruppe. **C** Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). **D** Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). **E** Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). **F** Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.

In der Kollagen X-Färbung hingegen konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. In allen hypertrophen Gruppen war wiederum im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe der Hypertrophie-Marker stark ausgeprägt. Jedoch zeigte auch die Gruppe mit der frühen BMS493-Behandlung (Abb. 26 C) nur eine schwache Anfärbung. Zwischen der hypertrophen Kontrollgruppe, der Gruppe mit der frühen RA-Behandlung (Abb. 26 E) sowie der späten BMS493-Gruppe (Abb. 26 D) bestanden kaum Unterschiede. Deutlich am stärksten ausgebildet war Kollagen X in

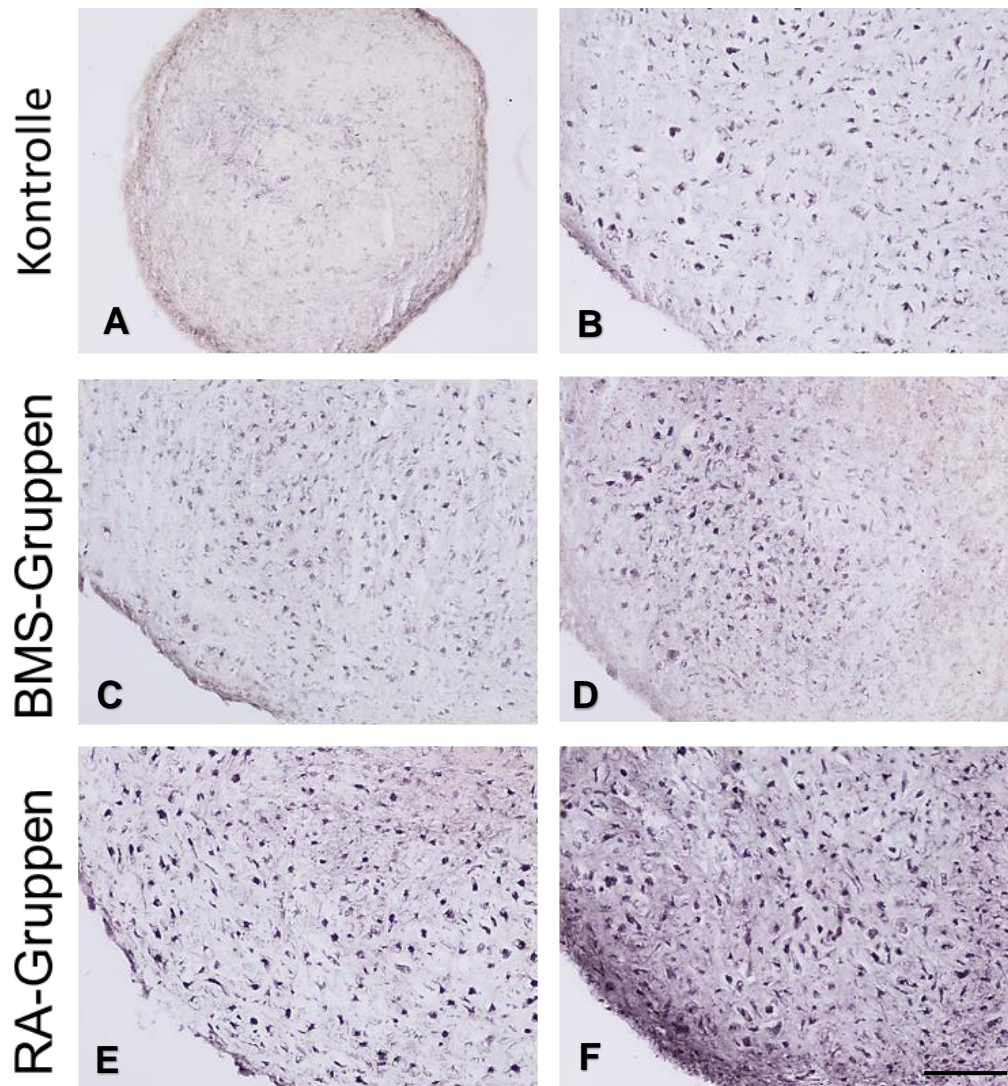


der Gruppe, in der RA erst spät hinzugegeben wurde. Hier war Kollagen X über das ganze Aggregat gleichmäßig stark gebildet (Abb. 26 F).



**Abbildung 26:** Kollagen X-Färbung (10-fache Vergrößerung), Tag 28. **A** Chondrogene Kontrollgruppe. **B** Hypertrophe Kontrollgruppe. **C** Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). **D** Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). **E** Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). **F** Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.

In der MMP13-Färbung waren ähnliche Resultate wie in der Kollagen X-Färbung feststellbar. Im Vergleich zur chondrogenen Vergleichsgruppe zeigten alle hypertrophen Aggregate eine vermehrte MMP13-Expression. Die Gruppe mit der frühen BMS-Behandlung zeigte in etwa eine gleiche, wenn nicht sogar schwächere Anfärbung von MMP13 als die hypertrophe Kontrollgruppe (Abb. 27 C). Erkennbar war zudem ein Unterschied zwischen den BMS-Gruppen. Hier trat in der Gruppe mit der späten BMS493-Behandlung (Abb. 27 D) eine stärkere Expression von MMP13 auf, in etwa gleich stark wie die hypertrophe Kontrollgruppe. Die beiden RA-Gruppen wiesen die stärkste MMP13-Färbung auf, wobei auch hier ein erheblicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand. Deutlich erkennbar war, dass die Gruppe, die erst spät mit dem Retinsäure-Agonisten behandelt worden war, mit Abstand am meisten MMP13 exprimierte (Abb. 27 F), gefolgt von der Gruppe, die die ersten 14 Tage mit RA behandelt worden war (Abb. 27 E).



**Abbildung 27:** MMP13-Färbung (10-fache Vergrößerung) am Tag 28 mit jeweiligen Gruppen. **A** Chondrogene Kontrollgruppe. **B** Hypertrophe Kontrollgruppe. **C** Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). **D** Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). **E** Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). **F** Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.

### 4.3.2 Genexpressionsanalyse

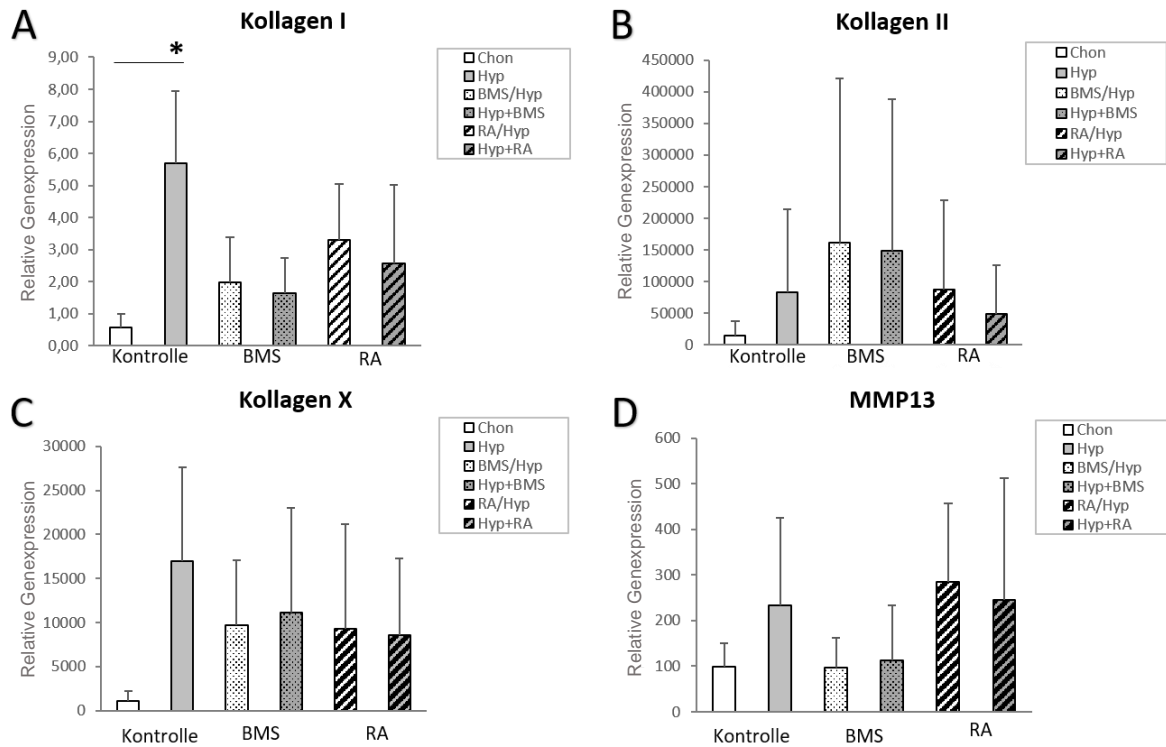
Um den Effekt des Retinsäure-Signalwegs auf die hypertrophe Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen noch deutlicher zu charakterisieren, wurde die Genexpression von Kollagen I, Kollagen II, Kollagen X, MMP13, RUNX2 sowie SOX9



in den Pellets an Tag 28 nach Zugabe von BMS493 und RA analysiert.

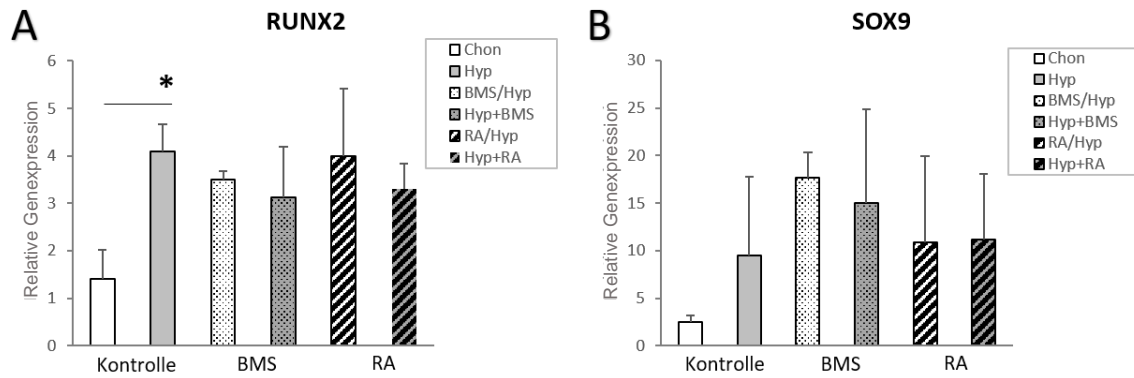
Während unter chondrogenen Bedingungen kein Unterschied zwischen den chondrogenen Pellets und den Pellets, die jeweils mit BMS493 oder RA behandelt wurden, auf Gen-Ebene feststellbar war (s. 4.2.2), traten deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen hypertrophen Aggregaten auf. Durch die Umstellung auf ein hypertrophes Medium mit der Zugabe von BMP4 stieg die Expression von Kollagen I und Kollagen II im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe in allen hypertrophen Aggregaten an. Zwischen der hypertrophen und der chondrogenen Kontrollgruppe trat ein signifikanter Unterschied in der Kollagen I Expression auf (Abb. 28 A). Die schwächste Expression von Kollagen I im Vergleich aller hypertrophen Bedingungen ließ sich bei den BMS-Gruppen feststellen, insbesondere bei der Gruppe, die erst im zweiten Abschnitt mit BMS behandelt worden war. Auf Kollagen II-Ebene (Abb.28 B) zeigten die BMS-Gruppen eine stärkere Expression, insbesondere die Gruppe mit der frühen BMS-Behandlung, jedoch ohne signifikante Unterschiede zu den anderen hypertrophen Gruppen. Die schwächste Kollagen II-Expression während der Hypertrophie zeigte die Gruppe, die erst spät mit RA behandelt worden war.

Als typische Hypertrophie-Marker wurde die Expression von Kollagen X und MMP13 bestimmt. Bei Kollagen X konnten im Vergleich zur histologischen Analyse keine relevanten Unterschiede zwischen den BMS- und den RA-Gruppen entdeckt werden. Die stärkste Kollagen-X-Expression zeigte die hypertrophe Kontrollgruppe (Abb. 28 C). Deutlichere Unterschiede ließen sich bei der Expression von MMP13 finden. Die Expression von MMP13 war bei den RA-Gruppen genauso hoch wie in der hypertrophen Kontrollgruppe. Die BMS-Gruppen zeigten hingegen eine ähnliche Expression wie die chondrogene Kontrollgruppe, also eine deutlich niedrigere als die hypertrophe Kontrollgruppe (Abb. 28 D).



**Abbildung 28:** Genexpressionsanalyse mithilfe real time PCR von Kollagen I, II, X und MMP13 unter jeweiligen Bedingungen am Tag 28, normalisiert zu d0; Referenzgen: PSMB4 (Proteasome subunit beta type-4); N=3; \*p ≤ 0.05

Zum weiteren Verständnis der verschiedenen Signalwege und zur Verfolgung möglicher Downstream-Signalwege des RA-Rezeptors wurde zudem die Expression der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9, wichtige Signalmoleküle in der Signalkaskade von TGF-β, bestimmt. Zwischen den hypertrophen Gruppen ließen sich bei der Expression von RUNX2 keine deutlichen Unterschiede erkennen (Abb. 29 A). Bei der Expression von SOX9 zeigten die BMS-Gruppen die stärkste Expression, vor allem die Gruppe, die BMS die ersten 14 Tage der Chondrogenese erhalten hatte (Abb. 29 B).

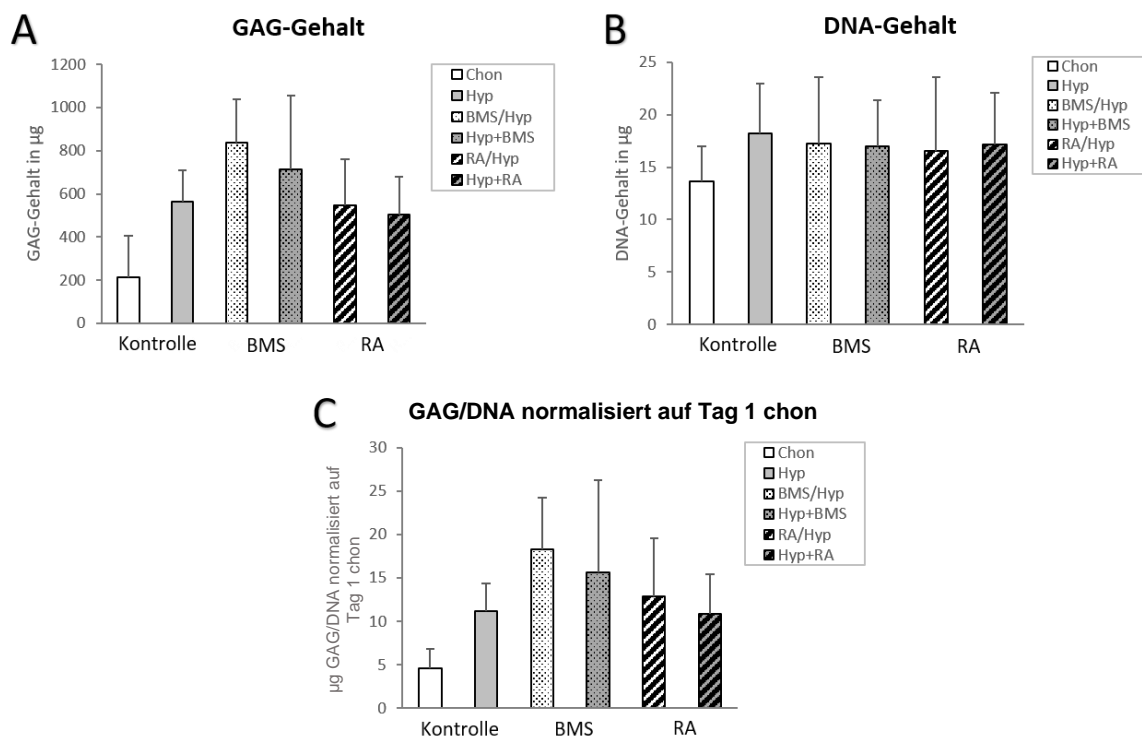


**Abbildung 29:** Genexpressionanalyse mithilfe real time PCR von RUNX2 und SOX9 unter jeweiligen Bedingungen am Tag 28, normalisiert zu d0; Referenzgen: PSMB4; N=3; \* $p \leq 0.05$

### 4.3.3 Biochemische Analyse

#### 4.3.3.1 Glykosaminoglykan (GAG)-Gehalt und DNA-Bestimmung

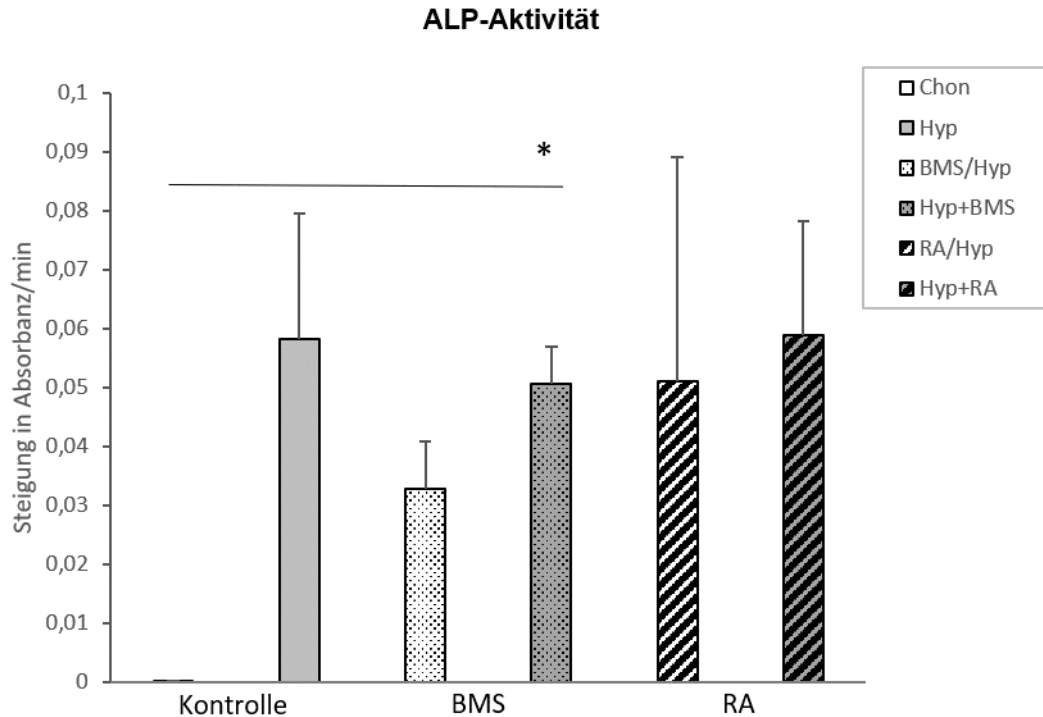
Im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe zeigte sich bei allen Gruppen unter hypertropen Bedingungen eine Zunahme des Glykosaminoglykan-Gehalts an Tag 28. Hierbei wiesen die mit dem Retinsäure-Agonisten behandelten Gruppen eine ähnliche Steigerung des GAG-Gehalts auf wie die hypertrophe Kontrollgruppe. Der höchste Glykosaminoglykan-Gehalt ließ sich, wenn auch nicht signifikant, in der frühen BMS-Gruppe erkennen, gefolgt von der Gruppe, die erst in der zweiten Hälfte mit BMS behandelt worden war.



**Abbildung 30:** **A** Bestimmung des GAG-Gehalts, **B** DNA-Gehalts und **C** GAG/DNA-Verhältnis normalisiert zur chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 1; Tag 28 unter jeweiligen Bedingungen; N=3.

#### 4.3.3.2 ALP-Aktivität im Überstand

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Kulturmedium wurde an Tag 28 gemessen. Als Aktivität wurde die Steigung der Absorbanz pro Minute festgelegt. Die ALP-Messung ergab, dass es, im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe, durch Induktion der Hypertrophie zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung der alkalischen Phosphatase in allen Gruppen kam. In der späten BMS-Gruppe trat ein signifikanter Unterschied zur chondrogenen Kontrollgruppe auf. Zwischen den hypertrophen Gruppen selbst konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Die Gruppe, die früh mit BMS behandelt worden war, zeigte im Vergleich zu den restlichen Gruppen die schwächste ALP-Aktivität (Abb. 31).

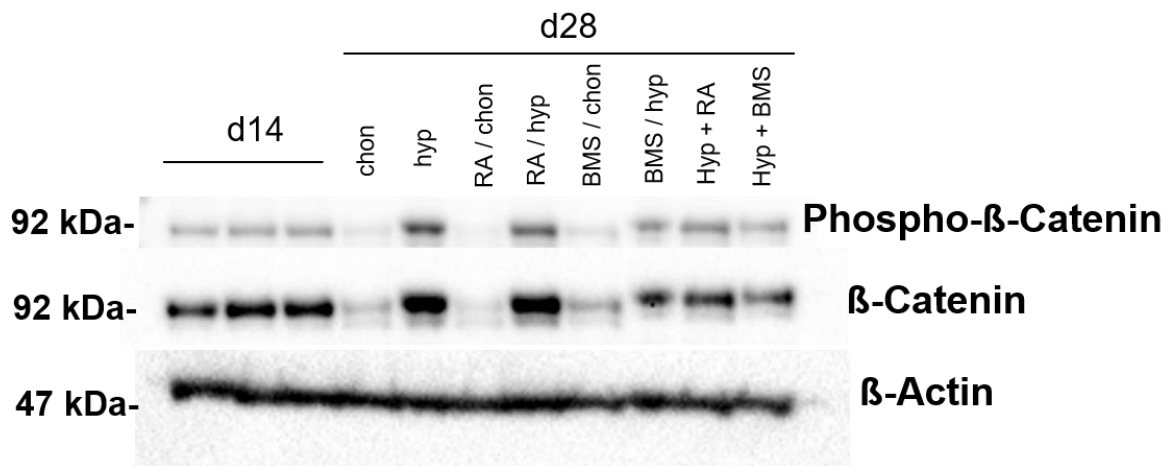


**Abbildung 31:** Aktivität der alkalischen Phosphatase an Tag 28 unter jeweiligen Bedingungen. Aktivität entspricht dem Anstieg der Absorbanz/min. Im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe findet sich unter hypertrophen Bedingungen ein Anstieg der ALP-Aktivität mit signifikantem Unterschied zwischen chondrogener Kontrollgruppe und später BMS-Gruppe (Chon-Hyp+BMS); n=3; \*p ≤ 0.05

#### 4.3.4 Protein- Analyse

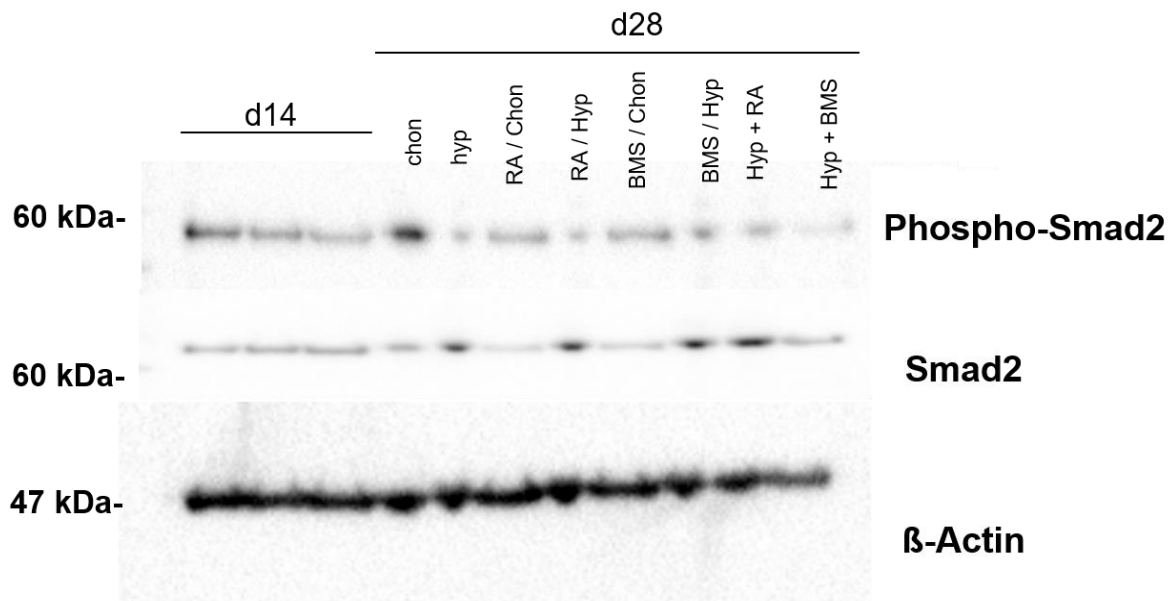
Mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg assoziierte Gene sind ebenso in der chondrogenen wie in der hypertrophen Differenzierung mesenchymal differenzierter Stammzellen involviert. Western-Blot-Analysen zeigten einen verstärkten Proteingehalt von  $\beta$ -Catenin in den chondrogenen Zellen an Tag 14 sowie in den hypertrophen Gruppen an Tag 28. In den chondrogenen Gruppen zeigte sich an Tag 28 ein niedriger Proteingehalt. Diese Daten zeigen eine verstärkte Aktivität des Wnt-Signalweges unter hypertrophen Bedingungen. In Abwesenheit von canonical Wnt wird  $\beta$ -Catenin im Zytosol von GSK-3 $\beta$  phosphoryliert, ubiquitiniert und es erfolgt der Abbau durch Proteasome. Die hier durchgeführten Western Blots zeigten jedoch einen größeren Proteingehalt an phosphorylierten  $\beta$ -Catenin in den hypertrophen

Gruppen an Tag 28, insbesondere in der hypertrophen Kontrollgruppe sowie in der hypertrophen Gruppe, die früh mit Retinsäure behandelt wurde.



**Abbildung 32:** Western Blot Analyse von Phospho-β-Catenin und β-Catenin. Die Menge an Phospho-β-Catenin, sowie β-Catenin ist verstärkt unter hypertrophen Bedingungen verglichen zu den chondrogenen Gruppen. β-Actin diente als Ladekontrolle.

Auch der TGFβ-Signalweg benutzt intrazelluläre Smad-Proteine, um das Signal des aktivierten Rezeptors in den Nukleus zu übertragen. Um zu überprüfen ob Unterschiede in der Aktivität des TGFβ-Signalweges in chondrogenen und hypertrophen Zellkulturen bestehen, wurden auch hierfür Western-Blot-Analysen für die phosphorylierte Form von Smad2 durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein deutlich verminderter Proteingehalt in den hypertrophen Gruppen. Während der chondrogenen Vordifferenzierung bis Tag 14 und in allen chondrogenen Gruppen an Tag 28 konnte phospho-Smad2 detektiert werden. Hingegen zeigte sich in den hypertrophen Gruppen an Tag 28 ein deutlich verstärkter Proteingehalt an Smad2. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass der TGFβ-Signalweg und somit die Phosphorylierung von Smad2 unter hypertrophen Bedingungen weniger aktiv ist als unter chondrogenen Bedingungen.



**Abbildung 33:** Western-Blot-Analyse von phospho-Smad2 und Smad2 unter den jeweiligen Bedingungen. Die Proteinmenge von phospho-Smad2 ist deutlich verstärkt unter chondrogenen Bedingungen, sowohl an Tag 14 als auch an Tag 28. β-Actin diente als Ladekontrolle.

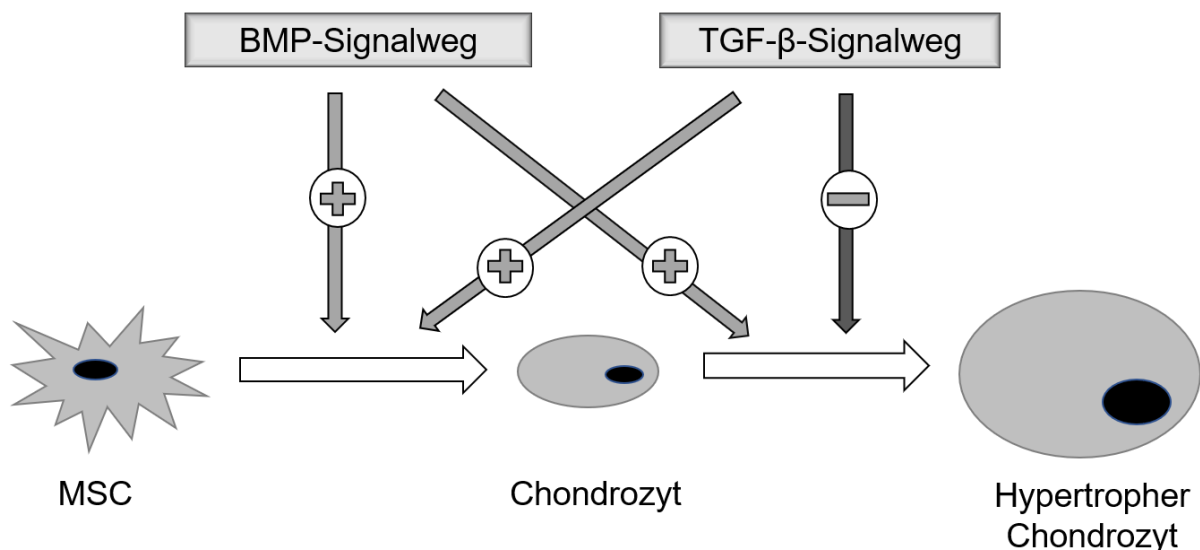
## 5 Diskussion

### 5.1 In-vitro-Differenzierung von hMSC's unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark sind zur chondrogenen Differenzierung fähig und stellen eine attraktive Zellquelle im Knorpel Tissue Engineering dar. Problematisch ist jedoch, dass Geno- und Phänotyp sehr variabel sind und unter anderem vom Entnahmeort, vom Spenderalter und von Komorbiditäten abhängen (Dimarino et al. 2013). Da Proliferations- und Regenerationsfähigkeit im menschlichen Alter abnehmen, wurden in der vorliegenden Arbeit Zellen von jungen Patienten verwendet (Alter zwischen 20 und 40 Jahren), da bei diesen ein besseres Differenzierungspotential zu erwarten ist. Die Isolierung aus dem Knochenmark ermöglicht eine risikoarme und vergleichsweise einfache Gewinnung einer großen Anzahl von Zellen. Dennoch handelt es sich hier um eine heterogene Zellpopulation und dementsprechend ist zu bedenken, dass verschiedene Zellen auf Faktoren in unterschiedlicher Art und Weise reagieren können (Heng et al. 2004; Augello et al. 2010). Das auch hier verwendete in-vitro-Chondrogenese-Modell von Johnstone und Yoo stellt ein ideales System zur Induktion einer erfolgreichen Chondrogenese und der darauffolgenden Untersuchung von Einflussfaktoren dar. Dennoch zeigen Chondrozyten während der in vitro-Differenzierung einen Trend, hypertrophe Marker zu exprimieren und terminal zu differenzieren (Yoo et al. 1998; Johnstone et al. 1998; Boeuf und Richter 2010; Studer et al. 2012; Mueller und Tuan 2008). Zur Untersuchung des hypertrophen Phänotyps wurde die Hypertrophie experimentell verstärkt durch einen Wechsel vom chondrogenen Medium mit TGF- $\beta$ 1 und Dexamethason auf ein hypertrophes Medium, bei dem TGF- $\beta$ 1 und Dexamthason durch BMP4 ersetzt wurde. TGF- $\beta$ 1 ist notwendig für eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung, hält Chondrozyten in einem prähypertrophen Phänotyp und wirkt der Hypertrophie entgegen (Ballock et al. 1993; Ferguson et al. 2000).



Die Auswirkung des BMP-Signalwegs auf die Chondrogenese ist sehr komplex und gleicht einem zweiseitigen Schwert: zum einen besitzt der Signalweg einen pro-chondrogenen Effekt mit einer gesteigerten chondrogenen Matrixsynthese, zum anderen zeigten zahlreiche Studien, dass insbesondere BMP2, 4 und 7 die Hypertrophie induzieren und die Knorpeldestruktion beschleunigen können. Insbesondere BMP4 wird dabei der potenteste Effekt zugesprochen (Chimal-Monroy et al. 2003; Yoon und Lyons 2004; Steinert et al. 2009; Tsumaki et al. 2002; Miljkovic et al. 2008; Volk et al. 2000). Diese zunächst gegenteilige Wirkung lässt sich jedoch mit der Abhängigkeit des Wachstumsfaktors vom Differenzierungsgrad der Zelle erklären (Li et al. 2018). Für eine erfolgreiche chondrogene und darauffolgende hypertrophe Differenzierung muss zum einen der TGF- $\beta$ -Signalweg downreguliert werden und gleichzeitig der BMP-Signalweg aktiviert werden. So führt eine alleinige Reduktion des TGF- $\beta$ - Signalweges zu keiner terminalen Differenzierung, sondern lediglich zu einer Dedifferenzierung der Chondrozyten. Eine Zugabe von BMP4 zum chondrogenem Medium, welches noch TGF- $\beta$  und Dexamethason enthält, war nicht suffizient zur Induktion der Hypertrophie (Karl 2013; Karl et al. 2014).



**Abbildung 34:** BMP und TGF- $\beta$  fördern die Chondrogenese in der frühen Differenzierungsphase. Auf die hypertrophe Differenzierung übt TGF- $\beta$  einen inhibitorischen und BMP einen stimulierenden Effekt aus.

Durch das beschriebene in-vitro-Hypertrophie-Modell konnte auch in dieser Studie ein hypertropher Phänotyp erfolgreich induziert werden. Die Zellen der hypertrophen Gruppen zeigten eine deutlich makroskopisch vergrößerte Aggregatbildung und ein mikroskopisch vergrößertes Zellvolumen und deutliche hypertrophe Zelllakunen. Sowohl auf histologischer Ebene als auch in der Genexpression zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Kollagen X- und MMP13-Produktion. Zudem war eine signifikante Erhöhung der Runx2-Expression zu beobachten. Runx2 wird in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten stark exprimiert und ist unerlässlich für die hypertrophe Differenzierung. In dominant-negativen Runx2 exprimierenden Mäusen erhielten Chondrozyten einen prähypertrophen Phänotyp aufrecht und verfehlten die Vollendung der endochondralen Ossifikation (Kuboki et al. 2003). Allerdings ist für die Runx2-abhängige Hypertrophie-Induktion und die Osteoblastendifferenzierung der BMP-Signalweg notwendig. Eine Inhibierung des BMP-Signalweges führt zu einer geminderten bis fehlenden Induktion der osteogenen und hypertrophen Marker (Lee et al. 2000; Phimphilai et al. 2006). Während auf Proteinebene kein Unterschied in der Kollagen I-Färbung zwischen chondrogener und hypertropher Gruppe bestand, ergab sich auf dem Genexpressionsniveau eine signifikante Erhöhung der Kollagen I- Expression in der hypertrophen Gruppe. Der Grund hierfür ist unklar, ursächlich könnten post-transkriptionelle Modulationen sein.

Sowohl in der Histologie als auch in der ALP-Aktivität zeigte sich, dass unter hypertrophen Bedingungen ALP deutlich verstärkt exprimiert wird. Während unter chondrogenen Bedingungen vereinzelt positive ALP-Zellen im Zentrum der Aggregate zu finden waren, verteilten sich diese in den hypertrophen Aggregaten im gesamten Pellet. Auffällig war ein intensiver ALP-positiver Ring um die Aggregate herum. Hierbei könnte es sich jedoch eher um Fibroblasten-ähnliche Zellen handeln, die das MSC-Pellet, einem Perichondrium gleich, umgeben, wie dies bereits in früheren Studien beschrieben worden war (Yoo et al. 1998; Karl 2013; Tavella et al. 1994). Expression von hypertrophen Markern zeigte sich jedoch auch in früheren Studien in den chondrogenen Gruppen. Johnstone et al. (1998) berichten, dass mRNA von Kollagen X bereits an Tag 7 präsent war und Peltari et al. (2006) sowie

Mwale et al. (2006) stellten die Verwendung von Kollagen X als hypertrophen Marker generell in Frage, da schon an Tag 2, noch vor der Induktion von Kollagen II, bereits Kollagen X detektierbar war. Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, dass hypertrophe Marker auch in chondrogenen Gruppen präsent sind, jedoch in einem deutlich geringeren Maß und somit Kollagen X durchaus als hypertropher Marker sinnvoll sein kann.

Interessanterweise zeigten die hypertrophen Gruppen auch einen stark chondrogen differenzierten Phänotyp, erkennbar durch eine vermehrte GAG-Produktion, intensivere DMMB-Färbung sowie auf Genexpressionslevel vermehrte Kollagen II-Expression. Passend dazu war auch die Sox9-Expression in der hypertrophen Gruppe an Tag 28 mehr als doppelt so hoch wie in der chondrogenen Gruppe, in welcher die Expression im Verlauf der 28-tägigen Differenzierungsphase kontinuierlich abnahm. Der pro-chondrogene Effekt wurde auch in anderen Studien nachgewiesen, in welchen BMP die Expression von Sox9 hochregulierte (Chimal-Monroy et al. 2003), die Rate und Menge an Chondrogenese steigerte (Hatakeyama et al. 2003) und auch internodulare mesenchymale Zellen dazu anregte, knorpelige Differenzierungsmarker, auch in Abwesenheit von TGF- $\beta$ 1 (Kuroda et al. 2006), zu exprimieren (Hatakeyama et al. 2004). Eine andere Erklärung könnte sein, dass die hier eingesetzte TGF- $\beta$ 1-Charge einen schwächeren Effekt hatte als das verwendete BMP4.

## **5.2 Einfluss des RA-Signalweges auf die Differenzierung von hMSC's**

### **5.2.1 BMS493- und RA-Effekte unter chondrogenen Bedingungen**

Eine große Anzahl von Studien zeigt, dass der Retinsäure-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Embryogenese, insbesondere während der skelettalen Entwicklung, spielt (Mammadova et al. 2016; Underhill und Weston 1998; Masuda et al. 2015). Die Auswirkungen von Retinsäure auf Proliferation, chondrogene Differenzierung und Knorpelhypertrophie werden jedoch nach wie vor kontrovers

diskutiert (Hagiwara et al. 1996; Takishita et al. 1990; Wang et al. 2008; Cowan et al. 2005; Underhill und Weston 1998; Diederichs et al. 2014; Kwon et al. 2011; Henderson et al. 2011).

Zur Untersuchung, welchen Einfluss der RA-Signalweg auf die Chondrogenese ausübt, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl all-trans RA (10nM) als auch der inverse Agonist BMS493 (2µM) einem serum-freien chondrogenem Medium für zwei Wochen hinzugefügt. Die letzten zwei Wochen (Tag 14 bis 28) wurden RA und BMS493 weggelassen und die Gruppen erhielten reines chondrogenes Differenzierungsmedium. RA- und BMS493-behandelte Gruppen wurden an Tag 1, Tag 14 und Tag 28 mit der Kontrollgruppe verglichen, welche über den gesamten Zeitraum chondrogenes Medium erhielt.

Bis Tag 14 zeigten sich histologisch keine signifikanten Unterschiede. Aggregate aller drei Gruppen waren von gleicher Größe, zeigten eine ähnliche DMMB-Färbung, sowie wenige, vereinzelt ALP-positive Zellen im Zentrum. Kollagen I ließ sich vorwiegend in der Peripherie anfärben und Kollagen II war nur schwach auf Proteinniveau exprimiert. Auch auf Genexpressionsebene zeigten alle drei Gruppen ähnliche Expressionsmuster ohne signifikante Unterschiede. Die Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 nahm innerhalb von zwei Wochen leicht ab, während es zu einem Anstieg des hypertrophen Transkriptionsfaktors Runx2 kam. Der GAG-Gehalt verdreifachte sich in allen Gruppen im Vergleich zu Tag 1. An Tag 28 zeigten die Gruppen ein mäßig vergrößertes Zellvolumen. DMMB-, ALP-, Kollagen I- und Kollagen II-Färbung wiesen keinen relevanten Unterschied zwischen den Gruppen auf. Im Vergleich zur Kollagen II-Färbung an Tag 14 war nun deutlich mehr Kollagen II in der Matrix detektierbar; im Zentrum der Gruppen mit BMS493 und RA zeigten sich teilweise ungefärbte Areale. Der Anstieg des Kollagen II-Gehalts auf Proteinebene war übereinstimmend mit der Genexpression. Hier zeigte sich jedoch ein deutlicherer Unterschied zwischen den Gruppen. In der chondrogenen Gruppe war die Kollagen II-Expression am höchsten. Die Kollagen X-Expression war deutlich erhöht an Tag 28 im Vergleich zu Tag 14 in allen drei Gruppen, jedoch zeigte die BMS493-Gruppe sowohl in der PCR als auch in der Histologie den geringsten Kollagen X-Gehalt. Auch in der MMP13 Färbung zeigte die BMS439-Gruppe zwar die

schwächste Anfärbung, jedoch auf Genexpressionsniveau die stärkste MMP13-Expression. Hierfür könnten wiederum post-transkriptionelle Veränderungen verantwortlich sein. Somit konnte hier nachgewiesen werden, dass die Zellen erfolgreich die chondrogene Differenzierung durchlaufen und dass sowohl Förderung als auch Inhibierung des Retinsäure-Signalweges keinen signifikanten Einfluss auf die Chondrogenese ausüben. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass Retinsäure die Kondensation, die Knorpelmatrixsynthese sowie die Sox9-Expression inhibiert (Galdones und Hales 2008; Horton et al. 1987; Lau et al. 1993; Zhang et al. 2015a). Die Downregulation von verschiedenen RAR-Isoformen stimulierte dort die Chondrogenese und war eine notwendige Voraussetzung zur erfolgreichen chondrogenen Induktion (Jiang et al. 1995; Cash et al. 1997). Erwähnenswert ist jedoch die Tatsache, dass diese Versuche alle in serum-haltigem Medium durchgeführt wurden, sowie mit größtenteils unphysiologisch hohen Konzentrationen an RA. Die physiologische Konzentrationen von all-trans RA während der embryonalen Extremitäten-Entwicklung von Hühnern wird auf 19-49 nM geschätzt (Underhill und Weston 1998), und Horton et al. (1987) zeigten eine reduzierte Knorpelsynthese bei einer Applikation von 3 µg/ml. Auch andere Studien zeigen, dass RA erst ab einer gewissen Konzentration inhibitorisch auf die Chondrogenese wirkt. Cho et al. (2003) wiesen nach, dass RA erst bei einer Konzentration von 25nM zu einer deutlichen Abnahme der Sox9- und Kollagen II-Expression führt. In Experimenten von Yu et al. (2006) erfolgte bei Konzentrationen von 1-5 µM eine Abnahme der GAG-Synthese in MSCs von Mäusen, während niedrigere Dosen an RA (0.1 und 0.5µM) keinen signifikanten Effekt hervorriefen. Im Gegensatz dazu zeigen frühere Studien, dass niedrige RA-Konzentrationen während der Embryogenese eine Skelett-Duplikation verursachen können (Tickle et al. 1982; Lee und Tickle 1985). Konzentrationen zwischen 5-50 ng/ml in distalen, mesodermalen Zellen sowie in mesenchymalen Zellen von Hühnerembryos führten zu einer Steigerung des GAG-Gehalts pro Zelle und einer verstärkten Alcian-blue Färbung der Knorpelmatrix als Zeichen eines erhöhten GAG-Gehaltes. Stärkere Konzentrationen ergaben jedoch eine dosis-abhängige Inhibierung der Chondrogenese (Ide und Aono 1988; Paulsen et al. 1988). Ähnlich dazu wiesen

Langille et al. (1989) im mandibulären Mesenchym von Hühnerembryos einen pro-chondrogenen Effekt von Retinsäure bis zu einer Konzentration von 10ng/ml nach, wobei insbesondere die ersten 24h der Kulturzeit entscheidend sind.

Interessanterweise zeigten Paulsen et al. (1988), dass niedrige RA-Konzentrationen bis zu 33nM unter serum-freien Bedingungen chondrogene Matrixproduktion fördern, während die gleichen Konzentrationen unter serum-enthaltenden Bedingungen die Chondrogenese inhibierten. Die unbekannte Menge von RA oder anderen Retinoiden in den Serum-Zusätzen (RA Levels in normalem Menschenserum reichen von 2.8-6.6 ng/ml) könnten, abhängig vom verwendeten Kulturmedium, verantwortlich sein für die unterschiedlichen Effekte von RA. Somit könnte Serum-enthaltendes Medium optimale physiologische Levels von RA besitzen, die exogene RA-Zugabe dann jedoch einen kritischen Schwellenwert überschreiten mit der Konsequenz eines inhibitorischen Einflusses auf die Chondrogenese. Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration von RA (10nM) befindet sich im physiologischen Bereich und unter den gegebenen serum-freien Bedingungen war folglich keine Inhibierung der Chondrogenese zu erkennen.

### **5.2.2 BMS493- und RA- Effekte unter hypertrophen Bedingungen**

Der Retinsäure-Signalweg spielt jedoch nicht nur eine Rolle für die frühe Kondensation und Bildung des hyalinen Knorpels, sondern er beeinflusst auch maßgeblich die weitere Entwicklung bereits differenzierter Chondrozyten. Pease und Wilson beobachteten Wachstumsverzögerung sowie einen frühzeitigen Verschluss der Wachstumsfuge bei Kindern und Tieren mit Hypervitaminose A (Pease 1962; Wilson et al. 1953). Studien in Monolayerkulturen zeigten, dass die Zugabe von Retinsäure eine Dedifferenzierung der Chondrozyten in Richtung eines flachen, Fibroblasten-ähnlichen Phänotyps bewirkte, welcher Fibronectin und die pro- $\alpha$ 1 Kette des Kollagen Typ III produzierte (Horton et al. 1987; Ballock et al. 1994). Andere Studien hingegen zeigten anhand von verstärkter Expression von ALP, Kollagen X, MMP13 und Kollagen I, dass RA sowohl die Chondrozyten-Hypertrophie als auch die

terminale Differenzierung bis zu einem osteogenen Phänotyp hin induziert (Li et al. 2014; Koyama et al. 1999).

In dieser Arbeit sollte durch Applikation von all-trans- RA und BMS493 unter hypertrophen Bedingungen untersucht werden, welche molekularen und phänotypischen Veränderungen dadurch in der späten Phase der chondrogenen Differenzierung hervorgerufen werden und ob der Zeitpunkt der RA-/BMS493-Behandlung eine Rolle spielt (siehe 3 Material und Methoden – Versuchsaufbau). Vorherige Studien hatten gezeigt, dass die Zugabe von RA die Expression des hypertrophen Transkriptionsfaktors Runx2 induzierte (Iwamoto et al. 2003; Kawaguchi et al. 2005) und zugleich die Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 inhibierte (Weston et al. 2003; Hoffman et al. 2006). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Studie auf Genexpressionsniveau kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und beiden RA-Gruppen (frühe und späte RA-Behandlung) festgestellt werden. Auch dies könnte jedoch, wie oben bereits beschrieben, mit den hier verwendeten serum-freien Kulturbedingungen und der eingesetzten Konzentration von all-trans RA erklärbar sein. In der PCR zeigte die Gruppe mit der späten RA-Behandlung unter allen hypertrophen Gruppen die schwächste Kollagen II-Expression. Sowohl eine frühe RA- als auch eine späte RA-Applikation steigerten in gleichem Ausmaß die Expression von MMP13.

In der Histologie unterschieden sich die RA-Aggregate sowohl hinsichtlich der Zellgröße als auch bezüglich der Färbungen von DMMB, Kollagen I und Kollagen II in Bezug auf den hypertrophen Phänotyp nicht von der hypertrophen Kontrollgruppe. Die Färbungen der hypertrophen Marker (ALP, MMP13 und Kollagen X) waren jedoch deutlich stärker, insbesondere in der Gruppe, welcher erst in der zweiten Hälfte der Differenzierungsphase RA hinzugefügt worden war. Dies zeigt, dass auf Proteinebene RA einen verstärkten hypertrophen Phänotyp induziert. Diese Befunde stimmen mit diversen Studien überein, in denen Retinsäure zu einer gesteigerten ALP-Aktivität und Kollagen X-Expression führte und somit Hypertrophie und Mineralisierung der extrazellulären Matrix förderte (Oettinger und Pacifici 1990; Iwamoto et al. 1993b; Pacifici et al. 1991). Cohen et al. (2006) wiesen nach, dass

RARs an eine RA-responsive-Region des Kollagen X-Genpromoters binden und somit direkt die Produktion von Kollagen X steigern können.

Andere Arbeitsgruppen beobachteten jedoch eine Inhibierung der Kollagen X-Synthese durch RA in terminal differenzierten Chondrozyten aus dem Femur und der Tibia von Hühnern. Dabei stellten sie zwar einen simultan positiven Effekt von RA auf die ALP-Aktivität fest, jedoch einen negativen Einfluss auf die Expression von Kollagen X (Wu et al. 1997a; Wu et al. 1997b, Takishita et al. 1990; Grimsrud et al. 1998). Diese teils gegensätzlichen Befunde in der Literatur könnten sich dadurch erklären, dass RA keinen stimulatorischen Effekt mehr ausübt, sobald Chondrozyten eine signifikante Menge an Kollagen X bereits exprimiert haben (und somit terminal differenziert sind). Möglicherweise wird hierdurch sogar die Kollagen X-Expression inhibiert (Iwamoto et al. 1993a; Li et al. 2014; Adams et al. 2007). Die Zugabe von Retinsäure zu Chondrozyten an Tag 14, welche zu diesem Zeitpunkt lediglich eine geringe Menge an Kollagen X exprimiert hatten, könnte in dieser Arbeit den verstärkten Effekt von RA auf die Kollagen X-Expression erklären.

Weiterhin wurde hier untersucht, welche Auswirkungen eine Inhibierung des RA-Signalweges auf die hypertrophe Differenzierung haben könnte. Dafür wurde BMS493 verwendet, ein inverser Agonist.

Ein neutraler Antagonist inhibiert an sich die Agonisten-induzierte Rekrutierung von Co-Aktivatoren und setzt somit durch gezielte Blockade eines RA-Rezeptors dessen Aktivität gleich null. Im Gegensatz dazu stabilisiert ein inverser Agonist nicht nur die Interaktion zwischen RAR und Co-Repressoren, sondern verstärkt diese auch noch durch Rekrutierung zusätzlicher Co-Repressoren und gilt somit als starker globaler Inhibitor durch verminderte Aktivität aller drei RAR (Germain et al. 2009).

Eine Behandlung mit BMS493 und somit die Inhibierung des RA-Signalweges unter hypertrophen Bedingungen führte zu einem verstärkten chondrogenen Phänotyp. Sowohl in der DMMB-Färbung als auch im GAG-Assay zeigten BMS493-Gruppen vermehrt sulfatierte Proteoglykane. Der pro-chondrogene Effekt ließ sich auch auf Genexpressionsebene verdeutlichen. Hier zeigte insbesondere die Gruppe mit der frühen BMS493-Behandlung im Vergleich zu den restlichen hypertrophen Gruppen die höchste Kollagen II- und Sox9-Expression, dicht gefolgt von der Gruppe mit der



späten BMS493-Behandlung. Zudem zeigte sich eine deutliche Reduktion der Hypertrophie durch die BMS493-Behandlung. Sowohl in der ALP-Färbung als auch in der Messung der ALP-Aktivität im Medium trat eine verminderte Expression in den BMS493-Gruppen auf. Auf Genexpressionslevel zeigte sich eine geringere Expression der hypertrophen und osteogenen Marker wie Kollagen I, MMP13 und Runx2. Während in der Genexpression von Kollagen X keine deutlichen Unterschiede zu den RA-Gruppen bestanden, ließ sich jedoch auf Proteinniveau eine deutlich geringere Matrixanfärbung für Kollagen X in den BMS-Gruppen finden. Insgesamt zeigte auch hier die Gruppe, die für die ersten zwei Wochen mit BMS493 behandelt wurde, einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Hypertrophie. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Studien überein, die zeigen, dass insbesondere die frühe Applikation von BMS493 die Chondrogenese fördert und zugleich einen inhibitorischen Einfluss auf die hypertrophe Differenzierung ausübt (Pfeifer et al. 2014; Yin et al. 2018; Shimo et al. 2005; Kirimoto et al. 2005). Auch Antagonisten einer spezifischen RAR-Isoform waren bereits in der Lage, sowohl die Chondrogenese zu induzieren als auch Hypertrophie zu unterdrücken. So konnte LE135, ein selektiver RAR- $\beta$  und RAR- $\alpha$  Antagonist, zum einen die Expression von Kollagen II und Aggrecan fördern und gleichzeitig die Kollagen X-Synthese mindern (Kafienah et al. 2007). Die Applikation eines RAR- $\alpha$  Antagonisten in mesenchymalen Zellkulturen von transgenen Mäusen, welche RAR- $\alpha$  überexprimierten, führte zur verstärkten Expression von Kollagen II und Sox9, während Kollagen I reduziert war (Hoffman et al. 2003). Kwon et al. (2011) zeigte, dass Citral, ein Inhibitor des RA-Signalwegs, in der kraniofazialen Skeletogenese zu einer Verzögerung der hypertrophen Zone führt, während es keinen negativen Einfluss auf die Proliferation hatte, wie dies zuvor in anderen Studien berichtet wurde (Kwon et al. 2011; Schneider et al. 2001; Wilson et al. 2003). Eine Blockierung aller drei Isoformen des RA-Rezeptors mittels eines pan-Antagonisten stellte sich als effektiver heraus als die Inhibierung einer einzelnen RAR-Isoform. So waren bereits niedrige Konzentrationen (10nM) eines pan-Antagonisten ausreichend, um in mesenchymalen Zellen aus Mäuseembryos eine

Steigerung der Knorpelbildung hervorzurufen, während mehr als 1  $\mu$ M eines spezifischen RAR- $\alpha$  Antagonisten für das selbe Resultat benötigt wurden (Weston et al. 2002). In einer Studie von Henderson et al. (2011) wurde zwar die hypertrophe Wirkung von RA im Gelenkknorpel von adulten Pferden bewiesen, gleichzeitig zeigte jedoch die Behandlung mit dem synthetischen RAR-Antagonisten LE135 an Tag 14 eine fibroblastische Erscheinung mit korrespondierender reduzierter Aggrecan-Expression. Diese im Vergleich zu den Ergebnissen von Kafienah (2007) widersprüchlichen Resultate könnten auf Spezies-spezifische Eigenschaften, eingesetzte Konzentrationen sowie unterschiedliche Kulturbedingungen zurückzuführen sein. In einer Studie von Koyama (1999) enthielt die Humerus-Diaphyse von Hühnerembryos, die sowohl mit einem pan-Antagonisten als auch mit einem spezifischen RAR- $\alpha$  Antagonisten behandelt worden waren, kleine Chondrozyten. Diese exprimierten weder Osteopontin noch Kollagen X und zeigten keine Hinweise auf endochondrale Ossifikation. Sowohl Kontroll-Humeri als auch mit den RAR-Antagonisten behandelte Humeri zeigten eine hohe Kollagen II-Expression. Somit kam die Studie zu dem Ergebnis, dass die Verwendung von RAR-Antagonisten zu keinen unerwünschten Nebeneffekten auf Zellvitalität oder zu einer Dedifferenzierung führt.

Die Stimulation oder Inhibierung des RA-Signalweges und die darauffolgenden Konsequenzen auf die hypertrophe Differenzierung stehen in einem engen Zusammenhang mit weiteren Signalwegen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass insbesondere die zeitgleiche Applikation von BMP4 und RA in einer verstärkten terminalen Differenzierung resultierte.

Retinsäure induzierte einerseits den BMP-Signalweg, sowohl durch Rekrutierung und gesteigerte Produktion von BMPs, andererseits verstärkte sie synergistisch die BMP-induzierte Mineralisierung und Expression hypertropher Gene (Zhang et al. 2010; Cowan et al. 2005; Grimsrud et al. 1998). In embryonalen Stammzellen aus Mäusen erfolgte beispielsweise eine erfolgreiche ALP-Induktion, nachdem die Zellaggregate mit Retinsäure und anschließend, während der weiteren Zelldifferenzierung, mit BMP4 behandelt worden waren (Kawaguchi et al. 2005).

Li et al. (2003) zeigten in einer Studie, dass Retinsäure allein nur mäßige Effekte auf Hypertrophie hat, während es synergistisch den Effekt von BMP2 auf die Osteopontin-, Kollagen I-Expression sowie die ALP-Aktivität steigerte. Dabei ergab sich nach RA-Behandlung ein deutlich erhöhtes Expressionslevel von Smad1 und Smad5, beides Downstream-Moleküle des BMP-Signalweges. Die Retinsäure kann eine Expression von Kollagen X stimulieren - zum einen direkt durch ein „Retinoic Acid Response Element“ auf den Kollagen X-Promotor (Cohen et al. 2006), zum anderen jedoch auch indirekt durch eine BMP-responsive Region des Kollagen X-Promoters. Dieser wird sowohl durch BMPs als auch durch physiologische Konzentrationen der Retinsäure in prähypertrophen Chondrozyten stimuliert (Adams et al. 2003).

Versuche mit Mäuseembryos ergaben jedoch umgekehrt reziproke Effekte des BMP- und RA-Signalweges. So zeigte sich in RA-Gruppen neben einer reduzierten Knorpelmatrix auch eine geringere BMP4-Expression, der canonical BMP-Signalweg war gesteigert durch ein Defizit von RAR- $\gamma$ , und BMP4 führte seinerseits zu einer dosis-abhängigen Abnahme des RAR-Reporters (Uchibe et al. 2017; Hoffman et al. 2006; Kwon et al. 2011).

Auch im Zusammenhang mit dem TGF- $\beta$ -Signalweg wurden in verschiedenen Studien dem RA-Signalweg spezifische Regulationsmechanismen zugeschrieben. So steigerte ein RAR-pan-Antagonist die Smad3- und Smad4-abhängige Transkriptionsaktivität (Uchibe et al. 2017), während eine Behandlung mit Retinsäure zu geringeren Phosphorylierungsniveaus von Smad2 und Smad3 führte und somit die Chondrogenese minderte (Zhang et al. 2009). Weiterhin wurde eine synergistische Wechselwirkung des RA-Signalweges mit dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beschrieben (Pavey et al. 2016; Shimono et al. 2011). Die Bindung von RA an RAR- $\gamma$  stimulierte die Genexpression von Wnt-Proteinen sowie deren Rezeptoren und verstärkte somit den pro-hypertrophen Effekt des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges. Fehlte jedoch Retinsäure, so band  $\beta$ -Catenin an den ungebundenen RAR- $\gamma$ -Rezeptor. Dadurch wurde die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF verhindert und der Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg blockiert. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt jedoch nur in Chondrozytenkulturen, während der RA-Signalweg in mesenchymalen

Zellkulturen lediglich den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibierte. Somit verändern sich Empfindlichkeit und Wechselwirkung zwischen diesen beiden Signalwegen während der chondrogenen Zelldifferenzierung, was unter anderem auf Veränderungen in der Expression der verschiedenen RA-Rezeptoren zurückgeführt werden kann (Yasuhara et al. 2010).

Es bedarf weiterer künftiger Untersuchungen, um die unterschiedlichen Interaktionen und gegenseitigen Regulationsmechanismen des RA-Signalweges mit diversen anderen Signalwegen zu verstehen, insbesondere hinsichtlich von Spezies-spezifischen Unterschieden, Expressionsdauer der verschiedenen Einflussfaktoren sowie der jeweiligen Konzentrationsdosis.

### 5.2.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, den komplexen Regulationsmechanismus der chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen weiter zu erforschen, insbesondere durch eine genauere Untersuchung des RA-Signalweges. Bisherige Studien haben gezeigt, dass Hypertrophie der chondrogen differenzierten MSC's ein fein abgestimmter Prozess ist, der von der Balance insbesondere des TGF- $\beta$ - und BMP-Signalwegs abhängt, aber auch von weiteren Signalwegen wie Wnt/ $\beta$ -Catein-Signalweg und RA-Signalweg. Die vorliegende Arbeit ergab keine Hinweise darauf, dass der RA-Signalweg wesentliche Einflüsse auf die in-vitro-Chondrogenese mesenchymaler Stammzellen hat. Allerdings gibt es starke Anhaltspunkte dafür, dass die hypertrophe Differenzierung maßgeblich durch die Aktivierung oder Inhibierung des RA-Signalweges beeinflusst wird. So stimulierte und steigerte eine physiologische Konzentration der all-trans Retinsäure die Hypertrophie und die terminale Differenzierung der Chondrozyten, insbesondere dann, wenn die Retinsäure erst in der späten Phase der Chondrogenese hinzugefügt wurde. Eine Inhibierung des Retinsäure-Signalweges führte zu einer Förderung der chondrogenen Differenzierung und zugleich zu einer Verzögerung und Inhibierung der Hypertrophie. Hier war der Effekt umso stärker, je früher BMS493 als inverser Agonist zur Differenzierung hinzugefügt wurde.

Die Ergebnisse können ein wichtiger Informationsgewinn für den Gebrauch von chondrogen differenzierten MSCs in der Knorpelreparatur sein. Es muss jedoch bedacht werden, dass die hier durchgeführten Versuche ausschließlich unter in-vitro-Bedingungen und unter serumfreien Bedingungen durchgeführt worden sind. Somit handelt es sich um ein artifizielles System, während Zellen in-vivo vielen weiteren Einflussfaktoren sowie biophysikalischen Größen ausgesetzt sind. Andererseits stellen die gewonnen in-vitro-Erkenntnisse eine wichtige Grundlage dar und tragen zur Verbesserung der Anwendung von MSC-basierten Knorpel-Konstrukten in-vivo bei. Bei einer in-vivo-Übertragung zunächst auf Tierversuche und eventuell später

auf Menschen ist zudem die Konzentration der verwendeten Retinsäure zu beachten. In dieser Arbeit konnte aus Kapazitätsgründen nur eine einzige RA-Dosis ausgetestet und für einen bestimmten Zeitraum angewandt werden. Für eine in-vivo-Anwendung muss sichergestellt sein, dass die verwendeten Konzentrationen keine unerwünschten Nebenwirkungen erzeugen. Vielversprechende Ergebnisse bei Mäusen ergaben bereits eine Studie von Shimono (2011). Die systemisch verwendete Retinsäure bzw. der Retinsäure-Antagonist führten zu keinen ungewollten Veränderungen hinsichtlich der Nahrungsaufnahme und des Blutbilds. Lediglich bei einer maximal eingesetzten Konzentration (RA: 12 mg/kg pro Tag; RA-Antagonist: 1.2 mg/kg pro Tag) führte Retinsäure zu Hautrötungen und zum Verlust von Schnurrhaaren, ein RA-Antagonist zu einer transienten Verzögerung der Knochenfrakturheilung.

Des Weiteren sind noch Untersuchungen und Fortschritte für einen erfolgreichen Transport der speziellen Faktoren an ihren Zielort („drug delivery“) notwendig. Wenn ein Agonist oder ein Antagonist direkt ins Gelenk appliziert wird, könnte das Protein aufgrund eines unerwünscht schnellen Abbaus im Gelenk ineffektiv werden oder nur schwer durch die Knorpelmatrix und andere Gewebe hindurch zum gewünschten Zielort gelangen. Die Gentherapie stellt für diese Problematik ein interessantes und vielversprechendes Konzept dar, um reine Wirkstoffe ohne einen Konzentrationsverlust in die gewünschte Zielregion zu transportieren (Trippel et al. 2007). Eine gezielte lokale Lieferung von BMP4 mittels Genvehikel steigerte die Chondrogenese effektiver als BMP4 ohne entsprechende Transporter (Kuroda et al. 2006). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass BMS493, ein hydrophobisches Molekül, unter physiologischen Bedingungen sehr instabil ist und schnell abgebaut wird. BMS493, eingekapselt in ein spezielles Spiralfeder-Protein aus COMP (cartilage oligomeric matrix protein), Serinresten und Elastin-Sequenzmotiven, zeigte hingegen eine deutliche Verbesserung seiner Effektivität. Es reduzierte die mRNA-Levels der Metalloproteinasen in der Anwesenheit von RA besser als unbehandeltes BMS493 (Yin et al. 2018).

Die in dieser Arbeit verwendeten mesenchymalen Stammzellen sind vielversprechende Kandidaten für ein erfolgreiches Knorpel-Tissue-Engineering, wenn es gelingt, die in-vitro induzierte Chondrogenese in diesen Zellen sowohl in-vitro als auch in-vivo zu stabilisieren und unerwünschte Nebenwirkungen weitgehend auszuschließen. Neben vielen verschiedenen Signalwegen hat sich hierbei der Retinsäure-Signalweg als ein effektiver Modulierungsfaktor und möglicher Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen herausgestellt. Weitere Studien und neue Erkenntnisse zur Inhibierung der Hypertrophie werden daher auch in Zukunft notwendig sein.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** **A** Darstellung des Kollagenetzwerk und Aggrecan mit Hyaluronsäure (Poole *et al.* 2001) **B** Kollagen Typ II Faser im Gelenkknorpel (Gelse et al. 2003).... 8
- Abbildung 2:** Darstellung der verschiedenen Zonen in einem erwachsenen Gelenkknorpel. Die eingefügten Bildausschnitte zeigen Durchmesser und Anordnung der Kollagenfibrillen in den jeweiligen Zonen (Poole et al. 2001, S28). ..... 10
- Abbildung 3:** Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen in verschiedene Zelllinien (Dimarino et al. 2013) ..... 16
- Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Endochondralen Ossifikation des Knochens. (A) Knorpelanlage. (B) Bildung des primären Ossifikationszentrums im Zentrum mit chondrogener Hypertrophie und vaskulärer Invasion. (C) Primäres Ossifikationszentrum mit Knochenmatrix und Blutgefäßen. (D) Bildung der sekundären Ossifikationszentren und der dazwischenliegenden Wachstumsfuge, welche für das Längenwachstum des Röhrenknochens verantwortlich ist. (E) Erwachsener Knochen mit geschlossenen Wachstumsfugen; Knorpel befindet sich nur noch als permanenter Gelenkknorpel an den Enden der Knochen. (Mackie et al. 2008, S. 48)..... 23
- Abbildung 5:** Mikroskopisches Präparat der Epiphysenfuge in H.E. Färbung (500fache Vergrößerung). **A** Proliferierende Zone. **B** Hypertrophe Zone. **C** Verknöcherungszone.  
(<https://www.amboss.com/de/library#xid=IJ0v8S&term=Ossifikation>) ..... 23
- Abbildung 6:** Mögliche Interaktion zwischen dem Wnt/ $\beta$ -Catenin und dem Retinsäure-Signalweg. Retinsäure transloziert mittels dem zellulären Retinsäure-Bindungsprotein II (CRABP II) in den Nukleus und bindet an den RA-Rezeptor. Dies aktiviert wiederum die Genexpression der Wnt-Proteine, Rezeptoren und Co-Rezeptoren und resultiert in einer verstärkten Expression hypertropher Marker, wie RUNX2, MMP13 und Kollagen X. (**RBP** Retinoid binding protein, **STRA6** stimulated by retinoic acid, **RDH** retinol dehydrogenase, **RALDH** retinaldehyde dehydrogenase, **RAR** retinoic acid receptor, **RXR** retinoic X receptor, **CRABP II** cellular retinoic acid binding protein, **RARE** retinoic acid response element, **GSK3** glycogen synthase kinase 3, **CoA** co-activator, **LRP** lipoprotein receptor related protein, **LEF/TCF** lymphoid enhancer binding factor/transcription factor) (Riedl et al. 2020)..... 34
- Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Inhibierung des Retinsäure-Signalweges durch BMS493. BMS493 transloziert mittels dem zellulären Retinsäure-Bindungsprotein II (CRAB II) in den Nukleus und bindet an den RAR/RXR-Komplex. Durch Rekrutierung weiterer Co-Repressoren inhibiert der Rezeptorkomplex die Expression der Zielgene an Promoter-Region RARE. Die verminderte Expression von Wnts und Wnt-Rezeptoren und Co-Rezeptoren reduziert die hypertrophe



Differenzierung. <b>RAR</b> retinoic acid receptor, <b>RXR</b> retinoic X receptor, <b>CRABP II</b> cellular retinoic acid binding protein, <b>RARE</b> retinoic acid response element, <b>CoA</b> co-activator, <b>CoR</b> co-repressor, <b>LRP</b> lipoproteinreceptor related protein, <b>LEF/TCF</b> lymphoid enhancer binding factor/transcription factor (Riedl et al. 2020). .....	38
<b>Abbildung 8:</b> PBMC Isolation mit Lymp (Quelle: PBMC Isolation using Lymphoprep 2018) .....	53
<b>Abbildung 9:</b> Histologisches Erscheinungsbild der MSC's Pellets 4-fache (A,C) (Maßstab = 400µm) und 10-fache (B,D) (Maßstab = 200µm) Vergrößerung) am Tag 28 unter chondrogenen (A, C) und hypertrophen (B, D) Bedingungen. A, B DMMB-Färbung. C, D Alkalische Phosphatase-Färbung (blau) mit Neutralrot als Gegenfärbung. Der hypertrophe Phänotyp mit vergrößertem Zellvolumen sowie die ALP-Aktivität sind unter hypertrophen Bedingungen (B, D) stärker vorhanden als unter chondrogenen Bedingungen (A, C). .....	67
<b>Abbildung 10:</b> Histologisches Erscheinungsbild der MSC's Pellets 4-fache (A,C) (Maßstab = 400µm) und 10-fache (B,D) (Maßstab = 200µm) Vergrößerung am Tag 28 unter chondrogenen (A, C) und hypertrophen (B, D) Bedingungen. A, B Kollagen I. C, D Kollagen II. ....	68
<b>Abbildung 11:</b> Histologisches Erscheinungsbild der MSC's Pellets 4-fache (A,C) (Maßstab = 400µm) und 10-fache (B,D) (Maßstab = 200µm) Vergrößerung am Tag 28 unter chondrogenen (A, C) und hypertrophen (B, D) Bedingungen. A, B Kollagen X. C, D MMP13. Vermehrte Anfärbung von sowohl Kollagen X als auch MMP13 unter hypertrophen Bedingungen (B, C) im Vergleich zu den chondrogenen Kontrollgruppen (A, C). .....	69
<b>Abbildung 12:</b> Genexpressionsanalyse mithilfe real-time-PCR von Kollagen I, II, X und MMP13, normalisiert zu Tag (d) 0 unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen am Tag (d) 28; Referenz-Gen: PSMB4 (Proteasome subunit beta type-4); N=3. Anstieg der Kollagen I, II, X, sowie der MMP13 Expression im Laufe der Zeit; verstärkte Expression in hypertrophen Gruppen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen hypertrophen und chondrogenen Gruppen (A-D), *p ≤ 0.05 .	70
<b>Abbildung 13:</b> Genexpressionsanalyse mittels real-time-PCR von RUNX2 und SOX9, normalisiert zu Tag 0 unter chondrogenen und hypertrophen Bedingungen am Tag 28; Referenzgen PSMB4; N=3. Signifikante Verstärkung der Expression von RUNX2 in den hypertrophen Gruppen im Vergleich zu den chondrogenen Kontrollgruppen, *p ≤ 0.05. Verminderte Expression von SOX9 im Laufe der Zeit in den chondrogenen Gruppen; kein signifikanter Unterschied zwischen hypertrophen und chondrogenen Aggregaten. ....	71
<b>Abbildung 14:</b> DNA-Gehalt (Figur A) und GAG-Gehalt (Figur B) pro Matrix in µg an Tag 1,14 und 28 unter hypertrophen und chondrogenen Bedingungen; N=3. ....	72
<b>Abbildung 15:</b> GAG-DNA-Verhältnis an den jeweiligen Entnahmetagen (Figur A), sowie GAG-DNA-Verhältnis, normalisiert zur chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 1 (Figur B); N=3 .....	72
<b>Abbildung 16:</b> Aggregate an Tag 14 (4-fache Vergrößerung) unter chondrogenen (A, D, G, J), chondrogenen+BMS (BMS: B, E, H, K) und chondrogenen+RA (RA: C, F, I,	

L) Bedingungen. A, B, C DMMB-Färbung. D, E, F ALP-Färbung. G, H, I Kollagen I-Färbung, J, K, L Kollagen II-Färbung. Maßstab =400µm.....	74
<b>Abbildung 17:</b> Aggregate an Tag 28 (4-fache Vergrößerung) unter chondrogenen (A, D, G, J), chondrogenen+BMS (BMS: B, E, H, K) und chondrogenen+RA (RA: C, F, I, L) Bedingungen. A, B, C DMMB-Färbung. D, E, F ALP-Färbung. G, H, I Kollagen I-Färbung, J, K, L Kollagen II-Färbung. Maßstab = 400µm.....	75
<b>Abbildung 18:</b> Aggregate (4-fache Vergrößerung) an Tag 28 unter chondrogenen (A, D), chondrogenen+BMS (BMS: B, E) und chondrogenen+RA (RA: C, F) Bedingungen. A, B, C Kollagen X-Färbung. D, E, F MMP13-Färbung. Maßstab = 400µm. ....	76
<b>Abbildung 19:</b> Genexpressionsanalyse mithilfe real time PCR von Kollagen I, II, X und MMP13, normalisiert zu PSMB4 (Proteasome subunit beta type-4) unter jeweiligen Bedingungen am Tag 1, 14 und 28; N=3 .....	77
<b>Abbildung 20:</b> Genexpressionsanalyse mittels real time PCR von RUNX2 und SOX9, normalisiert zu PSMB4 unter entsprechenden Bedingungen an Tag 1, 14 und 28; N=3.....	77
<b>Abbildung 21:</b> GAG-DNA-Verhältnis an den jeweiligen Entnahmetagen normalisiert zur chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 1; N=3.....	78
<b>Abbildung 22:</b> DMMB-Färbung (10-fache Vergrößerung) am Tag 28 unter jeweiligen Bedingungen. <b>A</b> Chondrogene Kontrollgruppe. <b>B</b> Hypertrophe Kontrollgruppe. <b>C</b> Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). <b>D</b> Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). <b>E</b> Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). <b>F</b> Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.....	80
<b>Abbildung 23:</b> Alkalische-Phosphatase-Färbung am Tag 28 (10-fache Vergrößerung); Gegenfärbun: Neutralrot. <b>A</b> Chondrogene Kontrollgruppe. <b>B</b> Hypertrophe Kontrollgruppe. <b>C</b> Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). <b>D</b> Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). <b>E</b> Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). <b>F</b> Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm. ....	81
<b>Abbildung 24:</b> Kollagen I-Färbung (10-fache Vergrößerung), Tag 28 mit jeweiligen Bedingungen. <b>A</b> Chondrogene Kontrollgruppe. <b>B</b> Hypertrophe Kontrollgruppe. <b>C</b> Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). <b>D</b> Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). <b>E</b> Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). <b>F</b> Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.....	82
<b>Abbildung 25:</b> Kollagen II-Färbung (10-fache Vergrößerung) mit jeweiligen Bedingungen am Tag 28. <b>A</b> Chondrogene Kontrollgruppe. <b>B</b> Hypertrophe Kontrollgruppe. <b>C</b> Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). <b>D</b> Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). <b>E</b> Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). <b>F</b> Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm. ....	83
<b>Abbildung 26:</b> Kollagen X-Färbung (10-fache Vergrößerung), Tag 28. <b>A</b> Chondrogene Kontrollgruppe. <b>B</b> Hypertrophe Kontrollgruppe. <b>C</b> Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). <b>D</b> Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). <b>E</b> Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). <b>F</b> Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm. ....	84

<b>Abbildung 27:</b> MMP13-Färbung (10-fache Vergrößerung) am Tag 28 mit jeweiligen Gruppen. <b>A</b> Chondrogene Kontrollgruppe. <b>B</b> Hypertrophe Kontrollgruppe. <b>C</b> Frühe Behandlung mit BMS493 (Tag1-Tag14). <b>D</b> Späte Behandlung mit BMS493 (Tag14-Tag28). <b>E</b> Frühe Behandlung mit RA (Tag1-Tag14). <b>F</b> Späte Behandlung mit RA (Tag14-Tag28). Maßstab = 200µm.....	86
<b>Abbildung 28:</b> Genexpressionsanalyse mithilfe real time PCR von Kollagen I, II, X und MMP13 unter jeweiligen Bedingungen am Tag 28, normalisiert zu d0; Referenzgen: PSMB4 (Proteasome subunit beta type-4); N=3; *p ≤ 0.05.....	88
<b>Abbildung 29:</b> Genexpressionanalyse mithilfe real time PCR von RUNX2 und SOX9 unter jeweiligen Bedingungen am Tag 28, normalisiert zu d0; Referenzgen: PSMB4; N=3; *p ≤ 0.05.....	89
<b>Abbildung 30:</b> <b>A</b> Bestimmung des GAG-Gehalts, <b>B</b> DNA-Gehalts und <b>C</b> GAG/DNA-Verhältnis normalisiert zur chondrogenen Kontrollgruppe an Tag 1; Tag 28 unter jeweiligen Bedingungen; N=3. ....	90
<b>Abbildung 31:</b> Aktivität der alkalischen Phosphatase an Tag 28 unter jeweiligen Bedingungen. Aktivität entspricht dem Anstieg der Absorbanz/min. Im Vergleich zur chondrogenen Kontrollgruppe findet sich unter hypertrophen Bedingungen ein Anstieg der ALP-Aktivität mit signifikantem Unterschied zwischen chondrogener Kontrollgruppe und später BMS-Gruppe (Chon-Hyp+BMS); n=3; *p ≤ 0.05.....	91
<b>Abbildung 32:</b> Western Blot Analyse von Phospho-β-Catenin und β-Catenin. Die Menge an Phospho-β-Catenin, sowie β-Catenin ist verstärkt unter hypertrophen Bedingungen verglichen zu den chondrogenen Gruppen. β-Actin diente als Ladekontrolle. ....	92
<b>Abbildung 33:</b> Western-Blot-Analyse von phospho-Smad2 und Smad2 unter den jeweiligen Bedingungen. Die Proteinmenge von phospho-Smad2 ist deutlich verstärkt unter chondrogenen Bedingungen, sowohl an Tag 14 als auch an Tag 28. β-Actin diente als Ladekontrolle.....	93
<b>Abbildung 34:</b> BMP und TGF-β fördern die Chondrogenese in der frühen Differenzierungsphase. Auf die hypertrophe Differenzierung übt TGF-β einen inhibitorischen und BMP einen stimulierenden Effekt aus. ....	95

## 6.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Schematischer Versuchsaufbau der Gruppen. Gr.1: chondrogen, Gr.: hypertroph, Gr3: chon+RA, Gr4: RA/Hyp, Gr5: chon+BMS, Gr.6: BMS/Hyp, Gr.7: Hyp+RA, Gr.8: Hyp+BMS.....	42
<b>Tabelle 2:</b> Rekombinante Proteine und Inhibitoren .....	42
<b>Tabelle 3 :</b> In der PCR verwendete Primer und Konzentrationen.....	43
<b>Tabelle 4:</b> Für Immunhistochemie und Western Blot Analyse verwendete Antikörper und Verdünnungen .....	45
<b>Tabelle 5:</b> Liste der verwendeten Kits .....	45

## 7 Literaturverzeichnis

- Adams, Christopher S.; Shapiro, Irving M. (2002): The fate of the terminally differentiated chondrocyte. Evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. In: *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 13 (6), S. 465–473.
- Adams, Sherrill L.; Cohen, Arthur J.; Lassoová, Luisa (2007): Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. In: *Journal of cellular physiology* 213 (3), S. 635–641. DOI: 10.1002/jcp.21262.
- Adams, Sherrill L.; Pallante, Kim M.; Niu, Zeling; Cohen, Arthur J.; Lu, Jane; LeBoy, Phoebe S. (2003): Stimulation of type-X collagen gene transcription by retinoids occurs in part through the BMP signaling pathway. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A Suppl 3, S. 29–33.
- Aglietti, P.; Ciardullo, A.; Giron, F.; Ponteggia, F. (2001): Results of arthroscopic excision of the fragment in the treatment of osteochondritis dissecans of the knee. In: *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 17 (7), S. 741–746. DOI: 10.1053/jars.2001.25336.
- Ai, Minrong; Cui, Yajun; Sy, Man-Sun; Lee, David M.; Zhang, Ling Xiu; Larson, Katherine M. et al. (2015): Anti-lubricin monoclonal antibodies created using lubricin-knockout mice immunodetect lubricin in several species and in patients with healthy and diseased joints. In: *PloS one* 10 (2), e0116237. DOI: 10.1371/journal.pone.0116237.
- Akiyama, Haruhiko; Chaboissier, Marie-Christine; Martin, James F.; Schedl, Andreas; Crombrughe, Benoit de (2002): The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. In: *Genes & development* 16 (21), S. 2813–2828. DOI: 10.1101/gad.1017802.
- Anderson, H. Clarke; Sipe, Joseph B.; Hessle, Lovisa; Dhanyamraju, Rama; Atti, Elisa; Camacho, Nancy P. et al. (2004): Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. In: *The American journal of pathology* 164 (3), S. 841–847.
- Andres, J. L.; Rönstrand, L.; Cheifetz, S.; Massagué, J. (1991): Purification of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteoglycan betaglycan. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (34), S. 23282–23287.

- Angele, P.; Zellner, J.; Englert, C.; Nerlich, M. (2005): Möglichkeiten der modernen Gelenkknorpelchirurgie - Mikrofrakturierung, osteochondrale Transplantation. In: *Akt Traumatol* 35 (5), S. 255–259. DOI: 10.1055/s-2005-865959.
- Arokoski, J. P.; Jurvelin, J. S.; Väättäinen, U.; Helminen, H. J. (2000): Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. In: *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 10 (4), S. 186–198.
- Ashton, B. A.; Allen, T. D.; Howlett, C. R.; Eaglesom, C. C.; Hattori, A.; Owen, M. (1980): Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. In: *Clinical orthopaedics and related research* (151), S. 294–307.
- Augello, Andrea; Kurth, Tobias B.; Bari, Cosimo de (2010): Mesenchymal stem cells. A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. In: *European cells & materials* 20, S. 121–133.
- Azizi, S. A.; Stokes, D.; Augelli, B. J.; DiGirolamo, C.; Prockop, D. J. (1998): Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (7), S. 3908–3913.
- Ballock, R. T.; Heydemann, A.; Wakefield, L. M.; Flanders, K. C.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B. (1993): TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes. Regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. In: *Developmental biology* 158 (2), S. 414–429. DOI: 10.1006/dbio.1993.1200.
- Ballock, R. T.; Heydemann, A.; Wakefield, L. M.; Flanders, K. C.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B. (1994): Inhibition of the chondrocyte phenotype by retinoic acid involves upregulation of metalloprotease genes independent of TGF-beta. In: *Journal of cellular physiology* 159 (2), S. 340–346. DOI: 10.1002/jcp.1041590217.
- Ballock, R. Tracy; O'Keefe, Regis J. (2003a): Physiology and pathophysiology of the growth plate. In: *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 69 (2), S. 123–143. DOI: 10.1002/bdrc.10014.
- Ballock, R. Tracy; O'Keefe, Regis J. (2003b): The biology of the growth plate. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A (4), S. 715–726.
- Banaszkiewicz, Paul A. (2014): *Classic Papers in Orthopaedics*. London: Springer London.
- Bandyopadhyay, Amitabha; Tsuji, Kunikazu; Cox, Karen; Harfe, Brian D.; Rosen, Vicki; Tabin, Clifford J. (2006): Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. In: *PLoS genetics* 2 (12), e216. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020216.
- Barry, F.; Boynton, R. E.; Liu, B.; Murphy, J. M. (2001): Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow. Differentiation-dependent gene

expression of matrix components. In: *Experimental cell research* 268 (2), S. 189–200. DOI: 10.1006/excr.2001.5278.

Bartlett, W.; Skinner, J. A.; Gooding, C. R.; Carrington, R. W. J.; Flanagan, A. M.; Briggs, T. W. R.; Bentley, G. (2005): Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee. A prospective, randomised study. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 87 (5), S. 640–645. DOI: 10.1302/0301-620X.87B5.15905.

Behrens, Peter; Bitter, Thomas; Kurz, Bodo; Russlies, Martin (2006): Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. In: *The Knee* 13 (3), S. 194–202. DOI: 10.1016/j.knee.2006.02.012.

Benthien, J. P.; Behrens, P. (2010): Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC). Combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing. In: *Cartilage* 1 (1), S. 65–68. DOI: 10.1177/1947603509360044.

Bert, J. M.; Maschka, K. (1989): The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis. A five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. In: *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 5 (1), S. 25–32.

Bhosale, Abhijit M.; Richardson, James B. (2008): Articular cartilage. Structure, injuries and review of management. In: *British medical bulletin* 87, S. 77–95. DOI: 10.1093/bmb/ldn025.

Bi, W.; Huang, W.; Whitworth, D. J.; Deng, J. M.; Zhang, Z.; Behringer, R. R.; Crombrughe, B. de (2001): Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12), S. 6698–6703. DOI: 10.1073/pnas.111092198.

Bian, Liming; Zhai, David Y.; Tous, Elena; Rai, Reena; Mauck, Robert L.; Burdick, Jason A. (2011): Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- $\beta$ 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo. In: *Biomaterials* 32 (27), S. 6425–6434. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.033.

Bobić, V. (1996): Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction. A preliminary clinical study. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 3 (4), S. 262–264.

Boeuf, Stephane; Richter, Wiltrud (2010): Chondrogenesis of mesenchymal stem cells. Role of tissue source and inducing factors. In: *Stem cell research & therapy* 1 (4), S. 31. DOI: 10.1186/scrt31.

- Bradley, Elizabeth W.; Drissi, M. Hicham (2011): Wnt5b regulates mesenchymal cell aggregation and chondrocyte differentiation through the planar cell polarity pathway. In: *Journal of cellular physiology* 226 (6), S. 1683–1693. DOI: 10.1002/jcp.22499.
- Breinan, H. A.; Hsu, H. P.; Spector, M. (2001): Chondral defects in animal models. Effects of selected repair procedures in canines. In: *Clinical orthopaedics and related research* (391 Suppl), S219-30.
- Brittberg, Mats (2008): Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up. In: *Injury* 39 Suppl 1, S40-9. DOI: 10.1016/j.injury.2008.01.040.
- Bruder, S. P.; Jaiswal, N.; Ricalton, N. S.; Mosca, J. D.; Kraus, K. H.; Kadiyala, S. (1998): Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. In: *Clinical orthopaedics and related research* (355 Suppl), S247-56.
- Buckwalter, J. A.; Lohmander, S. (1994): Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 76 (9), S. 1405–1418.
- Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. (1998): Articular cartilage repair and transplantation. In: *Arthritis and rheumatism* 41 (8), S. 1331–1342. DOI: 10.1002/1529-0131(199808)41:8<1331::AID-ART2>3.0.CO;2-J.
- Callahan, James F.; Burgess, Joelle L.; Fornwald, James A.; Gaster, Laramie M.; Harling, John D.; Harrington, Frank P. et al. (2002): Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). In: *Journal of medicinal chemistry* 45 (5), S. 999–1001.
- Cash, D. E.; Bock, C. B.; Schughart, K.; Linney, E.; Underhill, T. M. (1997): Retinoic acid receptor alpha function in vertebrate limb skeletogenesis. A modulator of chondrogenesis. In: *The Journal of cell biology* 136 (2), S. 445–457.
- Chen, Faye H.; Rousche, Kathleen T.; Tuan, Rocky S. (2006): Technology Insight. Adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. In: *Nature clinical practice. Rheumatology* 2 (7), S. 373–382. DOI: 10.1038/ncprheum0216.
- Chen, Faye H.; Tuan, Rocky S. (2008): Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. In: *Arthritis research & therapy* 10 (5), S. 223. DOI: 10.1186/ar2514.
- Chen, Jinwu; Wang, Changyong; Lü, Shuanghong; Wu, Junzheng; Guo, Ximin; Duan, Cuimi et al. (2005): In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. In: *Cell and tissue research* 319 (3), S. 429–438. DOI: 10.1007/s00441-004-1025-0.
- CHEN, P. (1991): Stimulation of chondrogenesis in limb bud mesoderm cells by recombinant human bone morphogenetic protein 2B (BMP-2B) and modulation by transforming growth factor ? 1 and ?2\*1. In: *Experimental cell research* 195 (2), S. 509–515. DOI: 10.1016/0014-4827(91)90403-H.

- Chimal-Monroy, J.; Rodriguez-Leon, J.; Montero, J. A.; Gañan, Y.; Macias, D.; Merino, R.; Hurlle, J. M. (2003): Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis. Sox genes and BMP signaling. In: *Developmental biology* 257 (2), S. 292–301.
- Cho, Seo-Hyun; Oh, Chun-Do; Kim, Song-Ja; Kim, Il-Chul; Chun, Jang-Soo (2003): Retinoic acid inhibits chondrogenesis of mesenchymal cells by sustaining expression of N-cadherin and its associated proteins. In: *Journal of cellular biochemistry* 89 (4), S. 837–847. DOI: 10.1002/jcb.10553.
- Chow, G.; Nietfeld, J. J.; Knudson, C. B.; Knudson, W. (1998): Antisense inhibition of chondrocyte CD44 expression leading to cartilage chondrolysis. In: *Arthritis and rheumatism* 41 (8), S. 1411–1419. DOI: 10.1002/1529-0131(199808)41:8<1411::AID-ART10>3.0.CO;2-Z.
- Chow, James C. Y.; Hantes, Michael E.; Houle, Jean Benoit; Zalavras, Charalampos G. (2004): Arthroscopic autogenous osteochondral transplantation for treating knee cartilage defects. A 2- to 5-year follow-up study. In: *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 20 (7), S. 681–690. DOI: 10.1016/j.arthro.2004.06.005.
- Chung, Kyu Sung; Ha, Jeong Ku; Yeom, Cheol Hyun; Ra, Ho Jong; Jang, Ho Su; Choi, Seung Hyuk; Kim, Jin Goo (2015): Comparison of Clinical and Radiologic Results Between Partial Meniscectomy and Refixation of Medial Meniscus Posterior Root Tears. A Minimum 5-Year Follow-up. In: *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 31 (10), S. 1941–1950. DOI: 10.1016/j.arthro.2015.03.035.
- Cohen, Arthur J.; Lassoová, Luisa; Golden, Eleanor B.; Niu, Zeling; Adams, Sherrill L. (2006): Retinoids directly activate the collagen X promoter in prehypertrophic chondrocytes through a distal retinoic acid response element. In: *Journal of cellular biochemistry* 99 (1), S. 269–278. DOI: 10.1002/jcb.20937.
- Coricor, George; Serra, Rosa (2016): TGF- $\beta$  regulates phosphorylation and stabilization of Sox9 protein in chondrocytes through p38 and Smad dependent mechanisms. In: *Scientific reports* 6, S. 38616. DOI: 10.1038/srep38616.
- Cowan, Catherine M.; Aalami, Oliver O.; Shi, Yun-Ying; Chou, Yu-Fen; Mari, Carina; Thomas, Romy et al. (2005): Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover. In: *Tissue engineering* 11 (3-4), S. 645–658. DOI: 10.1089/ten.2005.11.645.
- D'Angelo, M.; Billings, P. C.; Pacifici, M.; Leboy, P. S.; Kirsch, T. (2001): Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases (MMP). a role for matrix vesicle-



associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (14), S. 11347–11353. DOI: 10.1074/jbc.M009725200.

Dao, Debbie Y.; Jonason, Jennifer H.; Zhang, Yongchun; Hsu, Wei; Di Chen; Hilton, Matthew J.; O'Keefe, Regis J. (2012): Cartilage-specific  $\beta$ -catenin signaling regulates chondrocyte maturation, generation of ossification centers, and perichondrial bone formation during skeletal development. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (8), S. 1680–1694. DOI: 10.1002/jbmr.1639.

Day, Timothy F.; Guo, Xizhi; Garrett-Beal, Lisa; Yang, Yingzi (2005): Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. In: *Developmental cell* 8 (5), S. 739–750. DOI: 10.1016/j.devcel.2005.03.016.

Decker, Rebekah S. (2017): Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. In: *Seminars in cell & developmental biology* 62, S. 50–56. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.10.005.

Dell'Accio, F.; Bari, C. de; Luyten, F. P. (2001): Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. In: *Arthritis and rheumatism* 44 (7), S. 1608–1619. DOI: 10.1002/1529-0131(200107)44:7<1608::AID-ART284>3.0.CO;2-T.

Deshmukh, V.; Hu, H.; Barroga, C.; Bossard, C.; Kc, S.; Dellamary, L. et al. (2018): A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee. In: *Osteoarthritis and cartilage* 26 (1), S. 18–27. DOI: 10.1016/j.joca.2017.08.015.

Di Chen; Zhao, Ming; Mundy, Gregory R. (2004): Bone morphogenetic proteins. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22 (4), S. 233–241. DOI: 10.1080/08977190412331279890.

Diederichs, Solvig; Zachert, Kerstin; Raiss, Patric; Richter, Wiltrud (2014): Regulating chondrogenesis of human mesenchymal stromal cells with a retinoic Acid receptor-Beta inhibitor. Differential sensitivity of chondral versus osteochondral development. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 33 (6), S. 1607–1619. DOI: 10.1159/000358723.

Diekman, Brian O.; Rowland, Christopher R.; Lennon, Donald P.; Caplan, Arnold I.; Guilak, Farshid (2010): Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow. Induction by growth factors and cartilage-derived matrix. In: *Tissue engineering. Part A* 16 (2), S. 523–533. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0398.

Dimarino, Amy M.; Caplan, Arnold I.; Bonfield, Tracey L. (2013): Mesenchymal stem cells in tissue repair. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 201. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00201.

- Dozin, Beatrice; Malpeli, Mara; Camardella, Laura; Cancedda, Ranieri; Pietrangelo, Antonello (2002): Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines. Molecular and cellular aspects. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 21 (5), S. 449–459.
- Drissi, M. Hicham; Li, Xufeng; Sheu, Tzong J.; Zuscik, Michael J.; Schwarz, Edward M.; Puzas, J. Edward et al. (2003): Runx2/Cbfa1 stimulation by retinoic acid is potentiated by BMP2 signaling through interaction with Smad1 on the collagen X promoter in chondrocytes. In: *Journal of cellular biochemistry* 90 (6), S. 1287–1298. DOI: 10.1002/jcb.10677.
- Duprez, D. M.; Coltey, M.; Amthor, H.; Brickell, P. M.; Tickle, C. (1996): Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. In: *Developmental biology* 174 (2), S. 448–452. DOI: 10.1006/dbio.1996.0087.
- Dy, Peter; Wang, Weihuan; Bhattaram, Pallavi; Wang, Qiuqing; Wang, Lai; Ballock, R. Tracy; Lefebvre, Véronique (2012): Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. In: *Developmental cell* 22 (3), S. 597–609. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.12.024.
- Eldracher, Mona; Orth, Patrick; Cucchiari, Magali; Pape, Dietrich; Madry, Henning (2014): Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. In: *The American journal of sports medicine* 42 (11), S. 2741–2750. DOI: 10.1177/0363546514547029.
- Engel, M. E.; McDonnell, M. A.; Law, B. K.; Moses, H. L. (1999): Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (52), S. 37413–37420.
- Enomoto-Iwamoto, M.; Iwamoto, M.; Mukudai, Y.; Kawakami, Y.; Nohno, T.; Higuchi, Y. et al. (1998): Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. In: *The Journal of cell biology* 140 (2), S. 409–418.
- Feng, X. H.; Derynck, R. (1997): A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. In: *The EMBO journal* 16 (13), S. 3912–3923. DOI: 10.1093/emboj/16.13.3912.
- Ferguson, C. M.; Schwarz, E. M.; Reynolds, P. R.; Puzas, J. E.; Rosier, R. N.; O'Keefe, R. J. (2000): Smad2 and 3 mediate transforming growth factor-beta1-induced inhibition of chondrocyte maturation. In: *Endocrinology* 141 (12), S. 4728–4735. DOI: 10.1210/endo.141.12.7848.
- Forkel, Philipp; Foehr, Peter; Meyer, Johannes C.; Herbst, Elmar; Petersen, Wolf; Brucker, Peter U. et al. (2017): Biomechanical and viscoelastic properties of different posterior meniscal root fixation techniques. In: *Knee surgery, sports traumatology,*

*arthroscopy : official journal of the ESSKA* 25 (2), S. 403–410. DOI: 10.1007/s00167-016-4237-4.

Freyria, Anne-Marie; Mallein-Gerin, Frédéric (2012): Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair. The indisputable role of growth factors. In: *Injury* 43 (3), S. 259–265. DOI: 10.1016/j.injury.2011.05.035.

Friedenstein, A. J.; Chailakhjan, R. K.; Lalykina, K. S. (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. In: *Cell and tissue kinetics* 3 (4), S. 393–403.

Furumatsu, Takayuki; Ozaki, Toshifumi; Asahara, Hiroshi (2009): Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (5), S. 1198–1204. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.10.032.

Galdones, Eugene; Hales, Barbara F. (2008): Retinoic acid receptor gamma-induced misregulation of chondrogenesis in the murine limb bud in vitro. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 106 (1), S. 223–232. DOI: 10.1093/toxsci/kfn169.

Gaur, Tripti; Lengner, Christopher J.; Hovhannisyan, Hayk; Bhat, Ramesh A.; Bodine, Peter V. N.; Komm, Barry S. et al. (2005): Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (39), S. 33132–33140. DOI: 10.1074/jbc.M500608200.

Gaur, Tripti; Rich, Lillian; Lengner, Christopher J.; Hussain, Sadiq; Trevant, Brune; Ayers, David et al. (2006): Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation. In: *Journal of cellular physiology* 208 (1), S. 87–96. DOI: 10.1002/jcp.20637.

Gawlitta, Debby; Farrell, Eric; Malda, Jos; Creemers, Laura B.; Alblas, Jacqueline; Dhert, Wouter J. A. (2010): Modulating endochondral ossification of multipotent stromal cells for bone regeneration. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 16 (4), S. 385–395. DOI: 10.1089/ten.TEB.2009.0712.

Gelb, D. E.; Rosier, R. N.; Puzas, J. E. (1990): The production of transforming growth factor-beta by chick growth plate chondrocytes in short term monolayer culture. In: *Endocrinology* 127 (4), S. 1941–1947. DOI: 10.1210/endo-127-4-1941.

Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T. (2003): Collagens--structure, function, and biosynthesis. In: *Advanced drug delivery reviews* 55 (12), S. 1531–1546.

Geoffroy, Valérie; Kneissel, Michaela; Fournier, Brigitte; Boyde, Alan; Matthias, Patrick (2002): High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. In: *Molecular and cellular biology* 22 (17), S. 6222–6233.

Gerber, H. P.; Vu, T. H.; Ryan, A. M.; Kowalski, J.; Werb, Z.; Ferrara, N. (1999): VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis

during endochondral bone formation. In: *Nature medicine* 5 (6), S. 623–628. DOI: 10.1038/9467.

Germain, Pierre; Gaudon, Claudine; Pogenberg, Vivian; Sanglier, Sarah; van Dorselaer, Alain; Royer, Catherine A. et al. (2009): Differential action on coregulator interaction defines inverse retinoid agonists and neutral antagonists. In: *Chemistry & biology* 16 (5), S. 479–489. DOI: 10.1016/j.chembiol.2009.03.008.

Gray, A. M.; Mason, A. J. (1990): Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. In: *Science (New York, N. Y.)* 247 (4948), S. 1328–1330.

Grimsrud, C. D.; Romano, P. R.; D'Souza, M.; Puzas, J. E.; Schwarz, E. M.; Reynolds, P. R. et al. (2001): BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 19 (1), S. 18–25. DOI: 10.1016/S0736-0266(00)00017-6.

Grimsrud, C. D.; Rosier, R. N.; Puzas, J. E.; Reynolds, P. R.; Reynolds, S. D.; Hicks, D. G.; O'Keefe, R. J. (1998): Bone morphogenetic protein-7 in growth-plate chondrocytes. Regulation by retinoic acid is dependent on the stage of chondrocyte maturation. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 16 (2), S. 247–255. DOI: 10.1002/jor.1100160212.

Grotewold, L.; Plum, M.; Dildrop, R.; Peters, T.; R  ther, U. (2001): Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. In: *Mechanisms of development* 100 (2), S. 327–330.

Guo, Jun; Chung, Ung-II; Yang, Dehong; Karsenty, Gerard; Bringham, F. Richard; Kronenberg, Henry M. (2006): PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. In: *Developmental biology* 292 (1), S. 116–128. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.12.044.

Hagiwara, H.; Inoue, A.; Nakajo, S.; Nakaya, K.; Kojima, S.; Hirose, S. (1996): Inhibition of proliferation of chondrocytes by specific receptors in response to retinoids. In: *Biochemical and biophysical research communications* 222 (2), S. 220–224. DOI: 10.1006/bbrc.1996.0725.

Hall, B. K.; Miyake, T. (2000): All for one and one for all. Condensations and the initiation of skeletal development. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22 (2), S. 138–147. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4.

Hannallah, David; Peng, Hairong; Young, Brett; Usas, Arvydas; Gearhart, Brian; Huard, Johnny (2004): Retroviral delivery of Noggin inhibits the formation of heterotopic ossification induced by BMP-4, demineralized bone matrix, and trauma in an animal model. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 86-A (1), S. 80–91.

- Hardingham, Tim; Tew, Simon; Murdoch, Alan (2002): Tissue engineering. Chondrocytes and cartilage. In: *Arthritis research* 4 Suppl 3, S63-8. DOI: 10.1186/ar561.
- Hardouin, P.; Anselme, K.; Flautre, B.; Bianchi, F.; Bascouleguet, G.; Bouxin, B. (2000): Tissue engineering and skeletal diseases. In: *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 67 (5), S. 419–424.
- Hatakeyama, Yuji; Nguyen, Jennifer; Wang, Xibin; Nuckolls, Glen H.; Shum, Lillian (2003): Smad signaling in mesenchymal and chondroprogenitor cells. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A Suppl 3, S. 13–18.
- Hatakeyama, Yuji; Tuan, Rocky S.; Shum, Lillian (2004): Distinct functions of BMP4 and GDF5 in the regulation of chondrogenesis. In: *Journal of cellular biochemistry* 91 (6), S. 1204–1217. DOI: 10.1002/jcb.20019.
- Henderson, Sally E.; Santangelo, Kelly S.; Bertone, Alicia L. (2011): Chondrogenic effects of exogenous retinoic acid or a retinoic acid receptor antagonist (LE135) on equine chondrocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in monolayer culture. In: *American journal of veterinary research* 72 (7), S. 884–892. DOI: 10.2460/ajvr.72.7.884.
- Heng, Boon Chin; Cao, Tong; Lee, Eng Hin (2004): Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22 (7), S. 1152–1167. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0062.
- Hill, Theo P.; Später, Daniela; Taketo, Makoto M.; Birchmeier, Walter; Hartmann, Christine (2005): Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. In: *Developmental cell* 8 (5), S. 727–738. DOI: 10.1016/j.devcel.2005.02.013.
- Hoffman, Lisa M.; Garcha, Kamal; Karamboulas, Konstantina; Cowan, Matthew F.; Drysdale, Lindsay M.; Horton, William A.; Underhill, T. Michael (2006): BMP action in skeletogenesis involves attenuation of retinoid signaling. In: *The Journal of cell biology* 174 (1), S. 101–113. DOI: 10.1083/jcb.200604150.
- Hoffman, Lisa M.; Weston, Andrea D.; Underhill, T. Michael (2003): Molecular mechanisms regulating chondroblast differentiation. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 85-A Suppl 2, S. 124–132.
- Hogan, B. L. (1996): Bone morphogenetic proteins. Multifunctional regulators of vertebrate development. In: *Genes & development* 10 (13), S. 1580–1594.
- Horton, W. E.; Yamada, Y.; Hassell, J. R. (1987): Retinoic acid rapidly reduces cartilage matrix synthesis by altering gene transcription in chondrocytes. In: *Developmental biology* 123 (2), S. 508–516.
- Huang, W.; Chung, U. I.; Kronenberg, H. M.; Crombrugge, B. de (2001): The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid

hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (1), S. 160–165. DOI: 10.1073/pnas.011393998.

Huang, Xiaobin; Zhong, Leilei; Hendriks, Jan; Post, Janine N.; Karperien, Marcel (2018): The Effects of the WNT-Signaling Modulators BIO and PKF118-310 on the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. In: *International journal of molecular sciences* 19 (2). DOI: 10.3390/ijms19020561.

Hunziker, E. B. (2001): Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. In: *Osteoarthritis and cartilage* 9 (1), S. 22–32. DOI: 10.1053/joca.2000.0346.

Ichinose, Shizuko; Tagami, Motoki; Muneta, Takeshi; Sekiya, Ichiro (2005a): Morphological examination during in vitro cartilage formation by human mesenchymal stem cells. In: *Cell and tissue research* 322 (2), S. 217–226. DOI: 10.1007/s00441-005-1140-6.

Ichinose, Shizuko; Yamagata, Kazuo; Sekiya, Ichiro; Muneta, Takeshi; Tagami, Motoki (2005b): Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 32 (7), S. 561–570. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2005.04231.x.

Ide, H.; Aono, H. (1988): Retinoic acid promotes proliferation and chondrogenesis in the distal mesodermal cells of chick limb bud. In: *Developmental biology* 130 (2), S. 767–773.

Ikeda, Toshiyuki; Kamekura, Satoru; Mabuchi, Akihiko; Kou, Ikuyo; Seki, Shoji; Takato, Tsuyoshi et al. (2004): The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. In: *Arthritis and rheumatism* 50 (11), S. 3561–3573. DOI: 10.1002/art.20611.

Inada, M.; Yasui, T.; Nomura, S.; Miyake, S.; Deguchi, K.; Himeno, M. et al. (1999): Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 214 (4), S. 279–290. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199904)214:4<279::AID-AJA1>3.0.CO;2-W.

Indrawattana, Nitaya; Chen, Guoping; Tadokoro, Mika; Shann, Linzi H.; Ohgushi, Hajime; Tateishi, Tetsuya et al. (2004): Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. In: *Biochemical and biophysical research communications* 320 (3), S. 914–919. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.06.029.

Inman, Gareth J.; Nicolás, Francisco J.; Callahan, James F.; Harling, John D.; Gaster, Laramie M.; Reith, Alastair D. et al. (2002): SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin

- receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. In: *Molecular pharmacology* 62 (1), S. 65–74.
- Iwamoto, M.; Golden, E. B.; Adams, S. L.; Noji, S.; Pacifici, M. (1993a): Responsiveness to retinoic acid changes during chondrocyte maturation. In: *Experimental cell research* 205 (2), S. 213–224. DOI: 10.1006/excr.1993.1079.
- Iwamoto, M.; Kitagaki, J.; Tamamura, Y.; Gentili, C.; Koyama, E.; Enomoto, H. et al. (2003): Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). In: *Osteoarthritis and cartilage* 11 (1), S. 6–15.
- Iwamoto, M.; Shapiro, I. M.; Yagami, K.; Boskey, A. L.; Leboy, P. S.; Adams, S. L.; Pacifici, M. (1993b): Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes. In: *Experimental cell research* 207 (2), S. 413–420. DOI: 10.1006/excr.1993.1209.
- Jiang, H.; Soprano, D. R.; Li, S. W.; Soprano, K. J.; Penner, J. D.; Gyda, M.; Kochhar, D. M. (1995): Modulation of limb bud chondrogenesis by retinoic acid and retinoic acid receptors. In: *The International journal of developmental biology* 39 (4), S. 617–627.
- Jiménez, M. J.; Balbín, M.; Alvarez, J.; Komori, T.; Bianco, P.; Holmbeck, K. et al. (2001): A regulatory cascade involving retinoic acid, Cbfa1, and matrix metalloproteinases is coupled to the development of a process of perichondrial invasion and osteogenic differentiation during bone formation. In: *The Journal of cell biology* 155 (7), S. 1333–1344. DOI: 10.1083/jcb.200106147.
- Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M.; Yoo, J. U. (1998): In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. In: *Experimental cell research* 238 (1), S. 265–272. DOI: 10.1006/excr.1997.3858.
- Joyce, M. E.; Roberts, A. B.; Sporn, M. B.; Bolander, M. E. (1990): Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. In: *The Journal of cell biology* 110 (6), S. 2195–2207.
- Jubel, A.; Andermahr, J.; Koebke, J.; Häuselmann, H. J.; Rehm, K. E. (2002): Die Therapie von Gelenkknorpeldefekten1. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 127 (37), S. 1904–1908. DOI: 10.1055/s-2002-34070.
- Kafienah, Wael; Mistry, Sanjay; Perry, Mark J.; Politopoulou, Galatia; Hollander, Anthony P. (2007): Pharmacological regulation of adult stem cells. Chondrogenesis can be induced using a synthetic inhibitor of the retinoic acid receptor. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (10), S. 2460–2468. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0059.
- Karamesinis, Konstantinos; Spyropoulou, Anastasia; Dalagiorgou, Georgia; Katsianou, Maria A.; Nokhbehshaim, Marjan; Memmert, Svenja et al. (2017): Kontinuierlicher hydrostatischer Druck induziert Differenzierungsphänomene in

Chondrozyten durch Änderungen in Polyzystinen, SOX9 und RUNX2. In: *Journal of orofacial orthopedics = Fortschritte der Kieferorthopadie : Organ/official journal Deutsche Gesellschaft für Kieferorthopadie* 78 (1), S. 21–31. DOI: 10.1007/s00056-016-0061-1.

Karl, Alexandra (2013): The role of BMP and TGFbeta signalling in the terminal differentiation in the in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells.

Karl, Alexandra; Olbrich, Norman; Pfeifer, Christian; Berner, Arne; Zellner, Johannes; Kujat, Richard et al. (2014): Thyroid hormone-induced hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis is mediated by bone morphogenetic protein-4. In: *Tissue engineering. Part A* 20 (1-2), S. 178–188. DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0023.

Kawaguchi, Jitsutaro; Mee, Patrick J.; Smith, Austin G. (2005): Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. In: *Bone* 36 (5), S. 758–769. DOI: 10.1016/j.bone.2004.07.019.

Kawano, Yoshiaki; Kypta, Robert (2003): Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. In: *Journal of cell science* 116 (Pt 13), S. 2627–2634. DOI: 10.1242/jcs.00623.

Kern, Susanne; Eichler, Hermann; Stoeve, Johannes; Klüter, Harald; Bieback, Karen (2006): Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (5), S. 1294–1301. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342.

Kim, H. K.; Moran, M. E.; Salter, R. B. (1991): The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 73 (9), S. 1301–1315.

Kingsley, D. M. (1994): The TGF-beta superfamily. New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. In: *Genes & development* 8 (2), S. 133–146.

Kirimoto, Akiko; Takagi, Yuzo; Ohya, Keiichi; Shimokawa, Hitoyata (2005): Effects of retinoic acid on the differentiation of chondrogenic progenitor cells, ATDC5. In: *Journal of medical and dental sciences* 52 (3), S. 153–162.

Kolf, Catherine M.; Cho, Elizabeth; Tuan, Rocky S. (2007): Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells. Regulation of niche, self-renewal and differentiation. In: *Arthritis research & therapy* 9 (1), S. 204. DOI: 10.1186/ar2116.

Kopen, G. C.; Prockop, D. J.; Phinney, D. G. (1999): Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (19), S. 10711–10716.



- Koyama, E.; Golden, E. B.; Kirsch, T.; Adams, S. L.; Chandraratna, R. A.; Michaille, J. J.; Pacifici, M. (1999): Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis. In: *Developmental biology* 208 (2), S. 375–391. DOI: 10.1006/dbio.1999.9207.
- Kretzschmar, M.; Doody, J.; Timokhina, I.; Massagué, J. (1999): A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. In: *Genes & development* 13 (7), S. 804–816.
- Kronenberg, Henry M. (2003): Developmental regulation of the growth plate. In: *Nature* 423 (6937), S. 332–336. DOI: 10.1038/nature01657.
- Kronenberg, Henry M. (2005): How PTHrP controls growth plate chondrocytes. In: *IBMS BoneKEy* 2 (11), S. 7–15. DOI: 10.1138/20050181.
- Kuboki, Takuo; Kanyama, Manabu; Nakanishi, Tooru; Akiyama, Kentaro; Nawachi, Kumiko; Yatani, Hirofumi et al. (2003): Cbfa1/Runx2 gene expression in articular chondrocytes of the mice temporomandibular and knee joints in vivo. In: *Archives of oral biology* 48 (7), S. 519–525.
- Kuo, Catherine K.; Li, Wan-Ju; Mauck, Robert L.; Tuan, Rocky S. (2006): Cartilage tissue engineering. Its potential and uses. In: *Current opinion in rheumatology* 18 (1), S. 64–73.
- Kuroda, Ryosuke; Usas, Arvydas; Kubo, Seiji; Corsi, Karin; Peng, Hairong; Rose, Tim et al. (2006): Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. In: *Arthritis and rheumatism* 54 (2), S. 433–442. DOI: 10.1002/art.21632.
- Kwon, Hyuk-Jae; Shin, Jeong-Oh; Lee, Jong-Min; Cho, Kyoung-Won; Lee, Min-Jung; Cho, Sung-Won; Jung, Han-Sung (2011): Retinoic acid modulates chondrogenesis in the developing mouse cranial base. In: *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution* 316 (8), S. 574–583. DOI: 10.1002/jez.b.21432.
- Lange, Claudia; Schroeder, Jens; Stute, Norbert; Lioznov, Michael V.; Zander, Axel R. (2005): High-potential human mesenchymal stem cells. In: *Stem cells and development* 14 (1), S. 70–80. DOI: 10.1089/scd.2005.14.70.
- Langille, R. M.; Paulsen, D. F.; Solursh, M. (1989): Differential effects of physiological concentrations of retinoic acid in vitro on chondrogenesis and myogenesis in chick craniofacial mesenchyme. In: *Differentiation; research in biological diversity* 40 (2), S. 84–92.
- Lastres, P.; Letamendía, A.; Zhang, H.; Rius, C.; Almendro, N.; Raab, U. et al. (1996): Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. In: *The Journal of cell biology* 133 (5), S. 1109–1121.

- Lau, W. F.; Tertinegg, I.; Heersche, J. N. (1993): Effects of retinoic acid on cartilage differentiation in a chondrogenic cell line. In: *Teratology* 47 (6), S. 555–563. DOI: 10.1002/tera.1420470607.
- Le Blanc, K.; Ringdén, O. (2007): Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. In: *Journal of internal medicine* 262 (5), S. 509–525. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x.
- Leboy, P. S.; Sullivan, T. A.; Nooreyazdan, M.; Venezian, R. A. (1997): Rapid chondrocyte maturation by serum-free culture with BMP-2 and ascorbic acid. In: *Journal of cellular biochemistry* 66 (3), S. 394–403.
- Lee, J.; Tickle, C. (1985): Retinoic acid and pattern formation in the developing chick wing. SEM and quantitative studies of early effects on the apical ectodermal ridge and bud outgrowth. In: *Journal of embryology and experimental morphology* 90, S. 139–169.
- Lee, K.; Lanske, B.; Karaplis, A. C.; Deeds, J. D.; Kohno, H.; Nissenson, R. A. et al. (1996): Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. In: *Endocrinology* 137 (11), S. 5109–5118. DOI: 10.1210/endo.137.11.8895385.
- Lee, K. S.; Kim, H. J.; Li, Q. L.; Chi, X. Z.; Ueta, C.; Komori, T. et al. (2000): Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. In: *Molecular and cellular biology* 20 (23), S. 8783–8792.
- Lee, Tae-Jin; Jang, Jiho; Kang, Seokyung; Jin, Min; Shin, Heungsoo; Kim, Dong-Wook; Kim, Byung-Soo (2013): Enhancement of osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells by mesodermal lineage induction with BMP-4 and FGF2 treatment. In: *Biochemical and biophysical research communications* 430 (2), S. 793–797. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.067.
- Lefebvre, V.; Li, P.; Crombrugge, B. de (1998): A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. In: *The EMBO journal* 17 (19), S. 5718–5733. DOI: 10.1093/emboj/17.19.5718.
- Lefebvre, Véronique; Smits, Patrick (2005): Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. In: *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 75 (3), S. 200–212. DOI: 10.1002/bdrc.20048.
- Leijten, Jeroen C. H.; Bos, Steffan D.; Landman, Ellie B. M.; Georgi, Nicole; Jahr, Holger; Meulenbelt, Ingrid et al. (2013): GREM1, FRZB and DKK1 mRNA levels correlate with osteoarthritis and are regulated by osteoarthritis-associated factors. In: *Arthritis research & therapy* 15 (5), R126. DOI: 10.1186/ar4306.

- Li, Canfeng; Hu, Qinshen; Chen, Zhuo; Shen, Bin; Yang, Jing; Kang, Pengde et al. (2018): MicroRNA-140 Suppresses Human Chondrocytes Hypertrophy by Targeting SMAD1 and Controlling the Bone Morphogenetic Protein Pathway in Osteoarthritis. In: *The American journal of the medical sciences* 355 (5), S. 477–487. DOI: 10.1016/j.amjms.2018.01.004.
- Li, Jianmei; Dong, Shiwu (2016): The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. In: *Stem cells international* 2016, S. 2470351. DOI: 10.1155/2016/2470351.
- Li, Ning; Xu, Yusheng; Zhang, Huanhuan; Gao, Liyun; Li, Jue; Wang, Yongchao et al. (2014): Excessive retinoic acid impaired proliferation and differentiation of human fetal palatal chondrocytes (hFPCs). In: *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 101 (3), S. 276–282. DOI: 10.1002/bdrb.21110.
- Li, Tian-Fang; O'Keefe, Regis J.; Di Chen (2005): TGF-beta signaling in chondrocytes. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 10, S. 681–688.
- Li, Xuefeng; Schwarz, Edward M.; Zuscik, Michael J.; Rosier, Randy N.; Ionescu, Andreia M.; Puzas, J. Edward et al. (2003): Retinoic acid stimulates chondrocyte differentiation and enhances bone morphogenetic protein effects through induction of Smad1 and Smad5. In: *Endocrinology* 144 (6), S. 2514–2523. DOI: 10.1210/en.2002-220969.
- Lian, J. B.; McKee, M. D.; Todd, A. M.; Gerstenfeld, L. C. (1993): Induction of bone-related proteins, osteocalcin and osteopontin, and their matrix ultrastructural localization with development of chondrocyte hypertrophy in vitro. In: *Journal of cellular biochemistry* 52 (2), S. 206–219. DOI: 10.1002/jcb.240520212.
- Lin, H. (1997): The tao of stem cells in the germline. In: *Annual review of genetics* 31, S. 455–491. DOI: 10.1146/annurev.genet.31.1.455.
- López-Casillas, F.; Wrana, J. L.; Massagué, J. (1993): Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. In: *Cell* 73 (7), S. 1435–1444.
- Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Chichester, C. O.; Pittenger, M. F. (1998): Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. In: *Tissue engineering* 4 (4), S. 415–428. DOI: 10.1089/ten.1998.4.415.
- Mackie, E. J.; Ahmed, Y. A.; Tatarczuch, L.; Chen, K-S; Mirams, M. (2008): Endochondral ossification. How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (1), S. 46–62. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.06.009.
- Madry, H.; Ziegler, R.; Pape, D.; Cucchiari, M. (2014): Strukturelle Veränderungen im lateralen femorotibialen Kompartiment nach Tibiakopffosteotomie. In: *Der Orthopade* 43 (11), S. 958–965. DOI: 10.1007/s00132-014-3024-5.

- Mammadova, Aysel; Zhou, Huiqing; Carels, Carine E. L.; den Hoff, Johannes W. von (2016): Retinoic acid signalling in the development of the epidermis, the limbs and the secondary palate. In: *Differentiation; research in biological diversity* 92 (5), S. 326–335. DOI: 10.1016/j.diff.2016.05.001.
- Mankin, H. J. (1982): The response of articular cartilage to mechanical injury. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 64 (3), S. 460–466.
- Martin, J. A.; Buckwalter, J. A. (2001): Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. In: *The Iowa orthopaedic journal* 21, S. 1–7.
- Massagué, J. (1998): TGF-beta signal transduction. In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 753–791. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.
- Masuda, Eizo; Shirai, Kota; Maekubo, Kenji; Hirai, Yohei (2015): A newly established culture method highlights regulatory roles of retinoic acid on morphogenesis and calcification of mammalian limb cartilage. In: *BioTechniques* 58 (6), S. 318–324. DOI: 10.2144/000114300.
- Mendler, M.; Eich-Bender, S. G.; Vaughan, L.; Winterhalter, K. H.; Bruckner, P. (1989): Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. In: *The Journal of cell biology* 108 (1), S. 191–197.
- Messner, K.; Maletius, W. (1996): The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee. A 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. In: *Acta orthopaedica Scandinavica* 67 (2), S. 165–168.
- Miljkovic, N. D.; Cooper, G. M.; Marra, K. G. (2008): Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. In: *Osteoarthritis and cartilage* 16 (10), S. 1121–1130. DOI: 10.1016/j.joca.2008.03.003.
- Millan, F. A.; Denhez, F.; Kondaiah, P.; Akhurst, R. J. (1991): Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. In: *Development (Cambridge, England)* 111 (1), S. 131–143.
- Minas, T. (2012): A primer in cartilage repair. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 94 (11 Suppl A), S. 141–146. DOI: 10.1302/0301-620X.94B11.30679.
- Minina, E.; Wenzel, H. M.; Kreschel, C.; Karp, S.; Gaffield, W.; McMahon, A. P.; Vortkamp, A. (2001): BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. In: *Development (Cambridge, England)* 128 (22), S. 4523–4534.
- Minina, Eleonora; Kreschel, Conny; Naski, Michael C.; Ornitz, David M.; Vortkamp, Andrea (2002): Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates

chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. In: *Developmental cell* 3 (3), S. 439–449.

Mithoefer, Kai; Williams, Riley J.; Warren, Russell F.; Potter, Hollis G.; Spock, Christopher R.; Jones, Edward C. et al. (2005): The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 87 (9), S. 1911–1920. DOI: 10.2106/JBJS.D.02846.

Miyazono, Kohei; Kamiya, Yuto; Morikawa, Masato (2010): Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. In: *Journal of biochemistry* 147 (1), S. 35–51. DOI: 10.1093/jb/mvp148.

Mollenhauer, Juergen A. (2008): Perspectives on articular cartilage biology and osteoarthritis. In: *Injury* 39 Suppl 1, S5-12. DOI: 10.1016/j.injury.2008.01.044.

Mueller, Michael B.; Fischer, Maria; Zellner, Johannes; Berner, Arne; Dienstknecht, Thomas; Kujat, Richard et al. (2013): Effect of parathyroid hormone-related protein in an in vitro hypertrophy model for mesenchymal stem cell chondrogenesis. In: *International orthopaedics* 37 (5), S. 945–951. DOI: 10.1007/s00264-013-1800-1.

Mueller, Michael B.; Fischer, Maria; Zellner, Johannes; Berner, Arne; Dienstknecht, Thomas; Prantl, Lukas et al. (2010): Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis. Effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. In: *Cells, tissues, organs* 192 (3), S. 158–166. DOI: 10.1159/000313399.

Mueller, Michael B.; Tuan, Rocky S. (2008): Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. In: *Arthritis and rheumatism* 58 (5), S. 1377–1388. DOI: 10.1002/art.23370.

Müller, B.; Kohn, D. (1999): Indikation und Durchführung der Knorpel-Knochen-Anbohrung nach Pridie. In: *Der Orthopade* 28 (1), S. 4–10. DOI: 10.1007/s001320050315.

Mwale, Fackson; Stachura, Dorothy; Roughley, Peter; Antoniou, John (2006): Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 24 (8), S. 1791–1798. DOI: 10.1002/jor.20200.

Naito, Masako; Ohashi, Akiko; Takahashi, Tomihisa (2015): Dexamethasone inhibits chondrocyte differentiation by suppression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the chondrogenic cell line ATDC5. In: *Histochemistry and cell biology* 144 (3), S. 261–272. DOI: 10.1007/s00418-015-1334-2.

Nakao, A.; Afrakhte, M.; Morén, A.; Nakayama, T.; Christian, J. L.; Heuchel, R. et al. (1997): Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. In: *Nature* 389 (6651), S. 631–635. DOI: 10.1038/39369.

- Ng, L. J.; Wheatley, S.; Muscat, G. E.; Conway-Campbell, J.; Bowles, J.; Wright, E. et al. (1997): SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. In: *Developmental biology* 183 (1), S. 108–121. DOI: 10.1006/dbio.1996.8487.
- Nilsson, Ola; Marino, Rose; Luca, Francesco de; Phillip, Moshe; Baron, Jeffrey (2005): Endocrine regulation of the growth plate. In: *Hormone research* 64 (4), S. 157–165. DOI: 10.1159/000088791.
- Oettinger, H. F.; Pacifici, M. (1990): Type X collagen gene expression is transiently up-regulated by retinoic acid treatment in chick chondrocyte cultures. In: *Experimental cell research* 191 (2), S. 292–298.
- Okubo, Yasunori; Reddi, A. Hari (2003): Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. In: *Biochemical and biophysical research communications* 306 (1), S. 186–190.
- Onichtchouk, D.; Chen, Y. G.; Dosch, R.; Gawantka, V.; Delius, H.; Massagué, J.; Niehrs, C. (1999): Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. In: *Nature* 401 (6752), S. 480–485. DOI: 10.1038/46794.
- Owen, M. (1978): Histogenesis of bone cells. In: *Calcified tissue research* 25 (3), S. 205–207.
- Pacifici, M.; Golden, E. B.; Iwamoto, M.; Adams, S. L. (1991): Retinoic acid treatment induces type X collagen gene expression in cultured chick chondrocytes. In: *Experimental cell research* 195 (1), S. 38–46.
- Pathi, S.; Rutenberg, J. B.; Johnson, R. L.; Vortkamp, A. (1999): Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. In: *Developmental biology* 209 (2), S. 239–253. DOI: 10.1006/dbio.1998.9181.
- Paulsen, D. F.; Langille, R. M.; Dress, V.; Solursh, M. (1988): Selective stimulation of in vitro limb-bud chondrogenesis by retinoic acid. In: *Differentiation; research in biological diversity* 39 (2), S. 123–130.
- Pavey, Gabriel J.; Qureshi, Ammar T.; Tomasino, Allison M.; Honnold, Cary L.; Bishop, Danett K.; Agarwal, Shailesh et al. (2016): Targeted stimulation of retinoic acid receptor- $\gamma$  mitigates the formation of heterotopic ossification in an established blast-related traumatic injury model. In: *Bone* 90, S. 159–167. DOI: 10.1016/j.bone.2016.06.014.
- PBMC Isolation using Lymphoprep (2018). Online verfügbar unter <http://textbookhaematology4medical-scientist.blogspot.com/2014/07/pbmc-isolation-using-lymphoprep.html>, zuletzt aktualisiert am 05.09.2018, zuletzt geprüft am 06.09.2018.
- PEASE, C. N. (1962): Focal retardation and arrestment of growth of bones due to vitamin A intoxication. In: *JAMA* 182, S. 980–985.

- Pedrozo, H. A.; Schwartz, Z.; Gomez, R.; Ornoy, A.; Xin-Sheng, W.; Dallas, S. L. et al. (1998): Growth plate chondrocytes store latent transforming growth factor (TGF)-beta 1 in their matrix through latent TGF-beta 1 binding protein-1. In: *Journal of cellular physiology* 177 (2), S. 343–354. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199811)177:2<343::AID-JCP16>3.0.CO;2-A.
- Pelton, R. W.; Dickinson, M. E.; Moses, H. L.; Hogan, B. L. (1990): In situ hybridization analysis of TGF beta 3 RNA expression during mouse development. Comparative studies with TGF beta 1 and beta 2. In: *Development (Cambridge, England)* 110 (2), S. 609–620.
- Pelttari, Karoliina; Steck, Eric; Richter, Wiltrud (2008): The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. In: *Injury* 39 Suppl 1, S58-65. DOI: 10.1016/j.injury.2008.01.038.
- Pelttari, Karoliina; Winter, Anja; Steck, Eric; Goetzke, Katrin; Hennig, Thea; Ochs, Bjoern Gunnar et al. (2006): 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. In: *Arthritis and rheumatism* 54 (10), S. 3254–3266. DOI: 10.1002/art.22136.
- Pfeifer, Christian G.; Karl, Alexandra; Berner, Arne; Zellner, Johannes; Schmitz, Paul; Loibl, Markus et al. (2016): Expression of BMP and Actin Membrane Bound Inhibitor Is Increased during Terminal Differentiation of MSCs. In: *Stem cells international* 2016, S. 2685147. DOI: 10.1155/2016/2685147.
- Pfeifer et al. 2014: Attenuation of MSC Hypertrophy in 3D Culture via Treatment with a Retinoic Acid Receptor Inverse Agonist. Kim M, Farrell MJ, Pacifici M. ORS 2014 Annual Meeting. Online verfügbar unter <http://www.ors.org/Transactions/60/0424.pdf>, zuletzt geprüft am 09.09.2018.
- Phimphilai, Mattabhorn; Zhao, Zhouran; Boules, Heidi; Roca, Hernan; Franceschi, Renny T. (2006): BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21 (4), S. 637–646. DOI: 10.1359/jbmr.060109.
- Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411), S. 143–147.
- Pizette, S.; Niswander, L. (2000): BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis. Formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. In: *Developmental biology* 219 (2), S. 237–249. DOI: 10.1006/dbio.2000.9610.

- Poole, A. R.; Kojima, T.; Yasuda, T.; Mwale, F.; Kobayashi, M.; Lavery, S. (2001): Composition and structure of articular cartilage. A template for tissue repair. In: *Clinical orthopaedics and related research* (391 Suppl), S26-33.
- Potier, E.; Noailly, J.; Ito, K. (2010): Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. In: *Journal of biomechanics* 43 (5), S. 807–817. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.11.019.
- Pridie K. H., Zk, H., & Gordon-Strachan, G. 1959: A method of resurfacing osteoarthritis knee joints. In: *J Bone Jt Surg* (41), S. 618–619, zuletzt geprüft am 04.02.2020.
- Prydz, K.; Dalen, K. T. (2000): Synthesis and sorting of proteoglycans. In: *Journal of cell science* 113 Pt 2, S. 193–205.
- Pullig, O.; Pfander, D.; Swoboda, B. (2001): Molekulare Grundlagen der Arthroseinduktion und -progression. In: *Der Orthopade* 30 (11), S. 825–833.
- Reddi, A. H. (1994): Symbiosis of biotechnology and biomaterials. Applications in tissue engineering of bone and cartilage. In: *Journal of cellular biochemistry* 56 (2), S. 192–195. DOI: 10.1002/jcb.240560213.
- Rhee, David K.; Marcelino, Jose; Baker, MacArthur; Gong, Yaoqin; Smits, Patrick; Lefebvre, Véronique et al. (2005): The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (3), S. 622–631. DOI: 10.1172/JCI22263.
- Riedl, Moritz; Witzmann, Christina; Koch, Matthias; Lang, Siegmund; Kerschbaum, Maximilian; Baumann, Florian et al. (2020): Attenuation of Hypertrophy in Human MSCs via Treatment with a Retinoic Acid Receptor Inverse Agonist. In: *International journal of molecular sciences* 21 (4). DOI: 10.3390/ijms21041444.
- Rieux-Laucat, Frédéric; Magérus-Chatinet, Aude; Neven, Bénédicte (2018): The Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Defective FAS or FAS-Ligand Functions. In: *Journal of clinical immunology* 38 (5), S. 558–568. DOI: 10.1007/s10875-018-0523-x.
- Ryu, Je-Hwang; Kim, Song-Ja; Kim, Seon-Hee; Oh, Chun-Do; Hwang, Sang-Gu; Chun, Churl-Hong et al. (2002): Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin. In: *Development (Cambridge, England)* 129 (23), S. 5541–5550.
- Schewe, B.; Fritz, J.; Weise, K. (2008): Knorpelverletzungen am Kniegelenk. In: *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date* 3 (2), S. 77–94. DOI: 10.1055/s-2007-995662.
- Schmitt, Bernhard; Ringe, Jochen; Häupl, Thomas; Notter, Michael; Manz, Rudi; Burmester, Gerd-Rüdiger et al. (2003): BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. In:



*Differentiation; research in biological diversity* 71 (9-10), S. 567–577. DOI: 10.1111/j.1432-0436.2003.07109003.x.

Schneider, R. A.; Hu, D.; Rubenstein, J. L.; Maden, M.; Helms, J. A. (2001): Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. In: *Development (Cambridge, England)* 128 (14), S. 2755–2767.

Schofield, J. N.; Wolpert, L. (1990): Effect of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. In: *Experimental cell research* 191 (1), S. 144–148.

Scotti, Celeste; Tonnarelli, Beatrice; Papadimitropoulos, Adam; Scherberich, Arnaud; Schaeren, Stefan; Schauerte, Alexandra et al. (2010): Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (16), S. 7251–7256. DOI: 10.1073/pnas.1000302107.

Sekiya, I.; Tsuji, K.; Koopman, P.; Watanabe, H.; Yamada, Y.; Shinomiya, K. et al. (2000): SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (15), S. 10738–10744.

Sekiya, Ichiro; Vuoristo, Jussi T.; Larson, Benjamin L.; Prockop, Darwin J. (2002): In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7), S. 4397–4402. DOI: 10.1073/pnas.052716199.

Serra, R.; Johnson, M.; Filvaroff, E. H.; LaBorde, J.; Sheehan, D. M.; Derynck, R.; Moses, H. L. (1997): Expression of a truncated, kinase-defective TGF-beta type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. In: *The Journal of cell biology* 139 (2), S. 541–552.

Shi, Junjun; Zhang, Xin; Zhu, Jingxian; Pi, Yanbin; Hu, Xiaoqing; Zhou, Chunyan; Ao, Yingfang (2013): Nanoparticle delivery of the bone morphogenetic protein 4 gene to adipose-derived stem cells promotes articular cartilage repair in vitro and in vivo. In: *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 29 (12), 2001-2011.e2. DOI: 10.1016/j.arthro.2013.09.076.

Shimo, Tsuyoshi; Koyama, Eiki; Sugito, Hiroki; Wu, Changshan; Shimo, Satoko; Pacifici, Maurizio (2005): Retinoid signaling regulates CTGF expression in hypertrophic chondrocytes with differential involvement of MAP kinases. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20 (5), S. 867–877. DOI: 10.1359/JBMR.041235.

Shimono, Kengo; Morrison, Tiffany N.; Tung, Wei-en; Chandraratna, Roshantha A.; Williams, Julie A.; Iwamoto, Masahiro; Pacifici, Maurizio (2010): Inhibition of ectopic bone formation by a selective retinoic acid receptor alpha-agonist. A new therapy for heterotopic ossification? In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28 (2), S. 271–277. DOI: 10.1002/jor.20985.

Shimono, Kengo; Tung, Wei-en; Macolino, Christine; Chi, Amber Hsu-Tsai; Didizian, Johanna H.; Mundy, Christina et al. (2011): Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor- $\gamma$  agonists. In: *Nature medicine* 17 (4), S. 454–460. DOI: 10.1038/nm.2334.

Shum, Lillian; Wang, Xibin; Kane, Alex A.; Nuckolls, Glen H. (2003): BMP4 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy in the endochondral cranial base. In: *The International journal of developmental biology* 47 (6), S. 423–431.

Shwartz, Yulia; Viukov, Sergey; Krief, Sharon; Zelzer, Elazar (2016): Joint Development Involves a Continuous Influx of Gdf5-Positive Cells. In: *Cell reports* 15 (12), S. 2577–2587. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.05.055.

Simonian, P. T.; Sussmann, P. S.; Wickiewicz, T. L.; Paletta, G. A.; Warren, R. F. (1998): Contact pressures at osteochondral donor sites in the knee. In: *The American journal of sports medicine* 26 (4), S. 491–494. DOI: 10.1177/03635465980260040201.

Steadman, J. R.; Rodkey, W. G.; Briggs, K. K.; Rodrigo, J. J. (1999): Die Technik der Mikrofrakturierung zur Behandlung von kompletten Knorpeldefekten im Kniegelenk. In: *Der Orthopade* 28 (1), S. 26–32.

Steadman, J. R.; Rodkey, W. G.; Rodrigo, J. J. (2001): Microfracture. Surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. In: *Clinical orthopaedics and related research* (391 Suppl), S362-9.

Steinert, Andre F.; Proffen, Benedikt; Kunz, Manuela; Hendrich, Christian; Ghivizzani, Steven C.; Nöth, Ulrich et al. (2009): 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. In: *Arthritis research & therapy* 11 (5), R148. DOI: 10.1186/ar2822.

Stockwell, R. A. (1978): Chondrocytes. In: *Journal of clinical pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)* 12, S. 7–13.

Stone, K. R.; Rodkey, W. G.; Webber, R.; McKinney, L.; Steadman, J. R. (1992): Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically. In: *The American journal of sports medicine* 20 (2), S. 104–111. DOI: 10.1177/036354659202000202.

Studer, Deborah; Millan, Christopher; Öztürk, Ece; Maniura-Weber, Katharina; Zenobi-Wong, Marcy (2012): Molecular and biophysical mechanisms regulating

hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. In: *European cells & materials* 24, 118-35; discussion 135.

Takeda, S.; Bonnamy, J. P.; Owen, M. J.; Ducky, P.; Karsenty, G. (2001): Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. In: *Genes & development* 15 (4), S. 467–481. DOI: 10.1101/gad.845101.

Takishita, Y.; Hiraiwa, K.; Nagayama, M. (1990): Effect of retinoic acid on proliferation and differentiation of cultured chondrocytes in terminal differentiation. In: *Journal of biochemistry* 107 (4), S. 592–596.

Tamamura, Yoshihiro; Otani, Tomohiro; Kanatani, Naoko; Koyama, Eiki; Kitagaki, Jirota; Komori, Toshihisa et al. (2005): Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (19), S. 19185–19195. DOI: 10.1074/jbc.M414275200.

Tavella, S.; Raffo, P.; Tacchetti, C.; Cancedda, R.; Castagnola, P. (1994): N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. In: *Experimental cell research* 215 (2), S. 354–362. DOI: 10.1006/excr.1994.1352.

Thorp, B. H.; Anderson, I.; Jakowlew, S. B. (1992): Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 in cartilage and bone cells during endochondral ossification in the chick. In: *Development (Cambridge, England)* 114 (4), S. 907–911.

Tickle, C.; Alberts, B.; Wolpert, L.; Lee, J. (1982): Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. In: *Nature* 296 (5857), S. 564–566.

Trippel, S.; Cucchiaroni, M.; Madry, H.; Shi, S.; Wang, C. (2007): Gene therapy for articular cartilage repair. In: *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* 221 (5), S. 451–459. DOI: 10.1243/09544119JEIM237.

Tsumaki, Noriyuki; Nakase, Takanobu; Miyaji, Takahiro; Kakiuchi, Masaaki; Kimura, Tomoatsu; Ochi, Takahiro; Yoshikawa, Hideki (2002): Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17 (5), S. 898–906. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.5.898.

Tu, Xiaolin; Joeng, Kyu Sang; Nakayama, Keiichi I.; Nakayama, Keiko; Rajagopal, Jayaraj; Carroll, Thomas J. et al. (2007): Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. In: *Developmental cell* 12 (1), S. 113–127. DOI: 10.1016/j.devcel.2006.11.003.

- Tuan, Rocky S.; Boland, Genevieve; Tuli, Richard (2003): Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. In: *Arthritis research & therapy* 5 (1), S. 32–45.
- Uccelli, Antonio; Pistoia, Vito; Moretta, Lorenzo (2007): Mesenchymal stem cells. A new strategy for immunosuppression? In: *Trends in immunology* 28 (5), S. 219–226. DOI: 10.1016/j.it.2007.03.001.
- Uchibe, Kenta; Son, Jiyeon; Larmour, Colleen; Pacifici, Maurizio; Enomoto-Iwamoto, Motomi; Iwamoto, Masahiro (2017): Genetic and pharmacological inhibition of retinoic acid receptor  $\gamma$  function promotes endochondral bone formation. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 35 (5), S. 1096–1105. DOI: 10.1002/jor.23347.
- Ueta, C.; Iwamoto, M.; Kanatani, N.; Yoshida, C.; Liu, Y.; Enomoto-Iwamoto, M. et al. (2001): Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. In: *The Journal of cell biology* 153 (1), S. 87–100.
- Ulfig, Norbert (2015): *Kurzlehrbuch Histologie*. 4., korrigierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Underhill, T. M.; Weston, A. D. (1998): Retinoids and their receptors in skeletal development. In: *Microscopy research and technique* 43 (2), S. 137–155. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19981015)43:2<137::AID-JEMT7>3.0.CO;2-3.
- Urist, M. R. (1965): Bone. Formation by autoinduction. In: *Science (New York, N.Y.)* 150 (3698), S. 893–899.
- Usami, Yu; Gunawardena, Aruni T.; Iwamoto, Masahiro; Enomoto-Iwamoto, Motomi (2016): Wnt signaling in cartilage development and diseases. Lessons from animal studies. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 96 (2), S. 186–196. DOI: 10.1038/labinvest.2015.142.
- Volk, S. W.; D'Angelo, M.; Diefenderfer, D.; Leboy, P. S. (2000): Utilization of bone morphogenetic protein receptors during chondrocyte maturation. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 15 (8), S. 1630–1639. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.8.1630.
- Volk, S. W.; Luvalle, P.; Leask, T.; Leboy, P. S. (1998): A BMP responsive transcriptional region in the chicken type X collagen gene. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13 (10), S. 1521–1529. DOI: 10.1359/jbmr.1998.13.10.1521.
- Wang, Anxun; Ding, Xueqiang; Sheng, Shihu; Yao, Zhaoyou (2008): Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 375 (3), S. 435–439. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.08.036.

- Wang, Richard N.; Green, Jordan; Wang, Zhongliang; Deng, Youlin; Qiao, Min; Peabody, Michael et al. (2014): Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. In: *Genes & diseases* 1 (1), S. 87–105. DOI: 10.1016/j.gendis.2014.07.005.
- Wang, Xibin; Manner, Paul A.; Horner, Alan; Shum, Lillian; Tuan, Rocky S.; Nuckolls, Glen H. (2004): Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. In: *Osteoarthritis and cartilage* 12 (12), S. 963–973. DOI: 10.1016/j.joca.2004.08.008.
- Weston, A. D.; Rosen, V.; Chandraratna, R. A.; Underhill, T. M. (2000): Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways. In: *The Journal of cell biology* 148 (4), S. 679–690.
- Weston, Andrea D.; Chandraratna, Roshantha A. S.; Torchia, Joseph; Underhill, T. Michael (2002): Requirement for RAR-mediated gene repression in skeletal progenitor differentiation. In: *The Journal of cell biology* 158 (1), S. 39–51. DOI: 10.1083/jcb.200112029.
- Weston, Andrea D.; Hoffman, Lisa M.; Underhill, T. Michael (2003): Revisiting the role of retinoid signaling in skeletal development. In: *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 69 (2), S. 156–173. DOI: 10.1002/bdrc.10010.
- Wicks, S. J.; Lui, S.; Abdel-Wahab, N.; Mason, R. M.; Chantry, A. (2000): Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. In: *Molecular and cellular biology* 20 (21), S. 8103–8111.
- Wilson, L.; Gale, E.; Maden, M. (2003): The role of retinoic acid in the morphogenesis of the neural tube. In: *Journal of anatomy* 203 (4), S. 357–368.
- WILSON, J. G.; ROTH, C. B.; WARKANY, J. (1953): An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. In: *The American journal of anatomy* 92 (2), S. 189–217. DOI: 10.1002/aja.1000920202.
- Winter, Anja; Breit, Stephen; Parsch, Dominik; Benz, Karin; Steck, Eric; Hauner, Hans et al. (2003): Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids. A comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. In: *Arthritis and rheumatism* 48 (2), S. 418–429. DOI: 10.1002/art.10767.
- Wu, L. N.; Ishikawa, Y.; Genge, B. R.; Sampath, T. K.; Wuthier, R. E. (1997a): Effect of osteogenic protein-1 on the development and mineralization of primary cultures of avian growth plate chondrocytes. Modulation by retinoic acid. In: *Journal of cellular biochemistry* 67 (4), S. 498–513.
- Wu, L. N.; Ishikawa, Y.; Nie, D.; Genge, B. R.; Wuthier, R. E. (1997b): Retinoic acid stimulates matrix calcification and initiates type I collagen synthesis in primary

cultures of avian weight-bearing growth plate chondrocytes. In: *Journal of cellular biochemistry* 65 (2), S. 209–230.

Yakar, Shoshana; Rosen, Clifford J.; Beamer, Wesley G.; Ackert-Bicknell, Cheryl L.; Wu, Yiping; Liu, Jun-Li et al. (2002): Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. In: *The Journal of clinical investigation* 110 (6), S. 771–781. DOI: 10.1172/JCI15463.

Yakymovych, I.; Dijke, P. ten; Heldin, C. H.; Souchelnytskyi, S. (2001): Regulation of Smad signaling by protein kinase C. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (3), S. 553–555. DOI: 10.1096/fj.00-0474fje.

Yamagiwa, Hiroshi; Endo, Naoto (2009): Bone fracture and the healing mechanisms. Histological aspect of fracture healing. Primary and secondary healing. In: *Clinical calcium* 19 (5), S. 627–633.

Yamaguchi, K.; Shirakabe, K.; Shibuya, H.; Irie, K.; Oishi, I.; Ueno, N. et al. (1995): Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. In: *Science (New York, N.Y.)* 270 (5244), S. 2008–2011.

Yan, Jianyun; Li, Jun; Hu, Jun; Zhang, Lu; Wei, Chengguo; Sultana, Nishat et al. (2018): Smad4 deficiency impairs chondrocyte hypertrophy via the Runx2 transcription factor in mouse skeletal development. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (24), S. 9162–9175. DOI: 10.1074/jbc.RA118.001825.

Yang, X.; Chen, L.; Xu, X.; Li, C.; Huang, C.; Deng, C. X. (2001): TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. In: *The Journal of cell biology* 153 (1), S. 35–46.

Yasuhara, Rika; Yuasa, Takahito; Williams, Julie A.; Byers, Stephen W.; Shah, Salim; Pacifici, Maurizio et al. (2010): Wnt/beta-catenin and retinoic acid receptor signaling pathways interact to regulate chondrocyte function and matrix turnover. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (1), S. 317–327. DOI: 10.1074/jbc.M109.053926.

Yin, Liming; Agustinus, Albert S.; Yuvienco, Carlo; Minashima, Takeshi; Schnabel, Nicole L.; Kirsch, Thorsten; Montclare, Jin K. (2018): Engineered Coiled-Coil Protein for Delivery of Inverse Agonist for Osteoarthritis. In: *Biomacromolecules* 19 (5), S. 1614–1624. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00158.

Yoo, J. U.; Barthel, T. S.; Nishimura, K.; Solchaga, L.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M.; Johnstone, B. (1998): The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 80 (12), S. 1745–1757.

- Yoon, Byeong S.; Lyons, Karen M. (2004): Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. In: *Journal of cellular biochemistry* 93 (1), S. 93–103. DOI: 10.1002/jcb.20211.
- Yoshida, Carolina A.; Yamamoto, Hiromitsu; Fujita, Takashi; Furuichi, Tatsuya; Ito, Kosei; Inoue, Ken-ichi et al. (2004): Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. In: *Genes & development* 18 (8), S. 952–963. DOI: 10.1101/gad.1174704.
- Yu, Zengli; Xing, Ying (2006): All-trans retinoic acid inhibited chondrogenesis of mouse embryonic palate mesenchymal cells by down-regulation of TGF-beta/Smad signaling. In: *Biochemical and biophysical research communications* 340 (3), S. 929–934. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.100.
- Yuan, Xiaoliang; Liu, Haiqing; Huang, Hao; Liu, Hai; Li, Linfu; Yang, Jianqiong et al. (2016): The Key Role of Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Cartilage Chondrocytes. In: *Current drug targets* 17 (4), S. 475–484.
- Zhang, Hang; Li, Ning; Tang, Yunan; Wu, Weidong; Zhang, Qi; Yu, Zengli (2009): Negative functional interaction of retinoic acid and TGF-beta signaling mediated by TG-interacting factor during chondrogenesis. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 23 (1-3), S. 157–164. DOI: 10.1159/000204104.
- Zhang, Tao-Gen; Li, Xue-Dong; Yu, Guo-Yong; Xie, Peng; Wang, Yun-Guo; Liu, Zhao-Yong et al. (2015a): All-trans-retinoic acid inhibits chondrogenesis of rat embryo hindlimb bud mesenchymal cells by downregulating p53 expression. In: *Molecular medicine reports* 12 (1), S. 210–218. DOI: 10.3892/mmr.2015.3423.
- Zhang, Wenli; Deng, Zhong-Liang; Chen, Liang; Zuo, Guo-Wei; Luo, Qing; Shi, Qiong et al. (2010): Retinoic acids potentiate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. In: *PloS one* 5 (7), e11917. DOI: 10.1371/journal.pone.0011917.
- Zhang, Yao; Ross, A. Catharine (2013): Retinoic acid and the transcription factor MafB act together and differentially to regulate aggrecan and matrix metalloproteinase gene expression in neonatal chondrocytes. In: *Journal of cellular biochemistry* 114 (2), S. 471–479. DOI: 10.1002/jcb.24387.
- Zhang, Ying E. (2009): Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. In: *Cell research* 19 (1), S. 128–139. DOI: 10.1038/cr.2008.328.
- Zhang, Yinquan; Gao, Yulei; Cai, Lijun; Li, Fengning; Lou, Yi; Xu, Ning et al. (2017): MicroRNA-221 is involved in the regulation of osteoporosis through regulates RUNX2 protein expression and osteoblast differentiation. In: *American journal of translational research* 9 (1), S. 126–135.

Zhang, Zhiqi; Hou, Changhe; Meng, Fangang; Zhao, Xiaoyi; Zhang, Ziji; Huang, Guangxin et al. (2015b): MiR-455-3p regulates early chondrogenic differentiation via inhibiting Runx2. In: *FEBS letters* 589 (23), S. 3671–3678. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.09.032.

Zhao, Chen; Jiang, Wei; Zhou, Nian; Liao, Junyi; Yang, Mingming; Hu, Ning et al. (2017): Sox9 augments BMP2-induced chondrogenic differentiation by downregulating Smad7 in mesenchymal stem cells (MSCs). In: *Genes & diseases* 4 (4), S. 229–239. DOI: 10.1016/j.gendis.2017.10.004.

Zhong, Leilei; Huang, Xiaobin; Rodrigues, Emilie Dooms; Leijten, Jeroen C. H.; Verrips, Theo; El Khattabi, Mohamed et al. (2016): Endogenous DKK1 and FRZB Regulate Chondrogenesis and Hypertrophy in Three-Dimensional Cultures of Human Chondrocytes and Human Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem cells and development* 25 (23), S. 1808–1817. DOI: 10.1089/scd.2016.0222.

Zhu, Mei; Tang, Dezhi; Wu, Qiuqian; Hao, Suyang; Chen, Mo; Xie, Chao et al. (2009): Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24 (1), S. 12–21. DOI: 10.1359/jbmr.080901.



## 8 Danksagung

Mein Dank geht zunächst an Herrn Prof. Dr. Christian Pfeifer, der mir das Thema meiner Doktorarbeit nahegebracht und sie über mehrere Jahre hinweg geduldig betreut und gefördert hat. Vielen Dank für die stetige Erreichbarkeit, die konstante Unterstützung und den konstruktiven Austausch.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Volker Alt bedanke ich mich für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie Regensburg zu promovieren.

Frau Prof. Dr. Denitsa Docheva, Leiterin des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie, hat mit ihrem Elan und ihrer Begeisterung mein Interesse für das wissenschaftliche Forschen und Arbeiten im Labor geweckt und hat mich stets freundlich unterstützt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Daniela Drenkard bedanken. Die langen Monate im Labor wären ohne ihre unerlässliche Hilfe, ihre stete Unterstützung und ihre wiederholte Ermutigung kaum erfolgreich gewesen. Danke, Daniela, für deinen Einsatz, deine Geduld und die schöne Zeit im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich mich aber vor allem bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützen und stets ein offenes Ohr für mich haben.

