AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ORTHOPÄDIE
Prof. Dr. Dr. h. c. Joachim Grifka
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss von Substanz P und α-Calcitonin gene-related peptide auf die Chondrogenese und Zellvitalität von humanen mesenchymalen Stammzellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Wenig

2021

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ORTHOPÄDIE
Prof. Dr. Dr. h. c. Joachim Grifka
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss von Substanz P und α-Calcitonin gene-related peptide auf die Chondrogenese und Zellvitalität von humanen mesenchymalen Stammzellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Elisabeth Wenig

2021

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig
Berichterstatterin 1: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Grässel
Berichterstatter 2: PD Dr. rer. nat. Richard Bauer
Datum der mündlichen Prüfung: 17.11.2021

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung ..... - 1 -

1.1 Mesenchymale Stammzellen ..... - 1 -

1.2 Chondrogenese, Chondrozyten, Knorpel und chondrale Läsionen ..... - 2 -

1.2.1 Enchondrale Ossifikation ..... - 2 -

1.2.2 Morphologischer Aufbau der Wachstumsfuge und Aufbau der EZM ..... - 4 -

1.2.3 Hyaliner Knorpel ..... - 7 -

1.2.4 Chondrale und osteochondrale Läsionen ..... - 9 -

1.3 Osteoarthrose ..... - 10 -

1.4 Zellzyklus ..... - 12 -

1.5 Das sensible Nervensystem- Substanz P und αCGRP ..... - 15 -

1.5.1 Der Neurotransmitter αCGRP ..... - 15 -

1.5.2 Der sensible Neurotransmitter Substanz P ..... - 18 -

2 Ziel der Arbeit ..... - 22 -

3 Material und Methoden ..... - 23 -

3.1 Zellkultursystem ..... - 23 -

3.1.1 Aussaat und Passagieren der Zellen ..... - 23 -

3.1.1.1 Chondrogene Differenzierung – 3D-Zellkultur ..... - 23 -

3.1.1.2 Monolayer-Kultur – 2D-Zellkultur ..... - 24 -

3.1.2 Die Stimulation mit Neurotransmittern ..... - 25 -

3.2 Molekularbiologie ..... - 26 -

3.2.1 RNA-Isolierung aus hMSC ..... - 26 -

3.2.2 Konzentrationsbestimmung und cDNA-Synthese ..... - 26 -

3.2.3 Quantitative real-time PCR (qPCR) ..... - 27 -

3.3 Proteinbiochemie ..... - 29 -

3.3.1 Glykosaminoglykangehalt-Bestimmung in Fibringelen ..... - 29 -

3.3.1.1 DMMB-Assay ..... - 29 -

3.3.1.2 Picogreen-Assay ..... - 30 -

3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten ..... - 30 -

3.3.3 BCA-Assay ..... - 30 -

3.3.4 SDS-PAGE und Western-Blot ..... - 31 -
3.3.5 Kollagen II-ELISA ..... - 34 -
3.3.6 IL1ß-ELISA ..... - 35 -
3.4 Durchflusszytometrie ..... - 35 -
3.5 Alcianblaufärbung ..... - 36 -
3.6 Statistische Auswertung ..... - 37 -
4 Ergebnisse ..... - 38 -
4.1 Einfluss von SP und αCGRP während der chondrogenen Differenzierung von hMSC ..... - 38 -
4.1.1 Einfluss von SP und αCGRP auf die Genexpression ausgewählter Marker während der chondrogenen Differenzierung von hMSC ..... - 38 -
4.1.1.1 Genexpressionsänderung proinflammatorischer Zytokine unter Einfluss von SP und αCGRP ..... - 38 -
4.1.1.2 Die Expression chondrogener Markergene unter Einfluss von SP und αCGRP ..... - 42 -
4.1.1.2.1 SOX 9 ..... - 42 -
4.1.1.2.2 COL2A1 und COL10A1 ..... - 44 -
4.1.1.2.3 COL1A1 und COL3A1 ..... - 47 -
4.1.1.3 Die Expression des Anti-Apoptose-Markergens BCL2 unter Einfluss von SP und αCGRP ..... - 49 -
4.1.1.4 Die Expression der Wachstumsfaktoren FGF2 und BMP6 unter Einfluss von SP und αCGRP ..... - 51 -
4.1.2 Veränderungen in der GAG-Produktion nach Stimulation mit SP und αCGRP ..... - 52 -
4.1.3 Einfluss von SP und αCGRP auf die EZM Struktur ..... - 53 -
4.1.4 Verminderter Kollagen II Gehalt nach Stimulation mit αCGRP ..... - 54 -
4.1.5 IL1ß im Zellüberstand der Fibringele ..... - 55 -
4.2 Einfluss von SP und αCGRP auf undifferenzierte hMSC ..... - 55 -
4.2.1 Änderung der Proteinexpression von Cyclin D1, Sox9 und Phospho-Sox9 unter SP bzw. αCGRP Stimulation ..... - 55 -
4.2.2 Änderung der Zellzyklusverteilung nach Stimulation mit SP und αCGRP ..... - 58 -

4.2.3 Veränderte Genexpression in hMSC nach SP bzw. αCGRP Stimulierung in Monolayer-Kultur ..... - 61 -
4.2.3.1 Einfluss der Stimulation von SP auf die FGF2 und VEGFα Genexpression ..... - 61 -
4.2.3.2 Einfluss der Stimulation von αCGRP auf die Zelladhäsion ..... - 62 -
4.2.3.3 SOX9 Genexpression in undifferenzierten hMSC ..... - 63 -
4.2.3.4 Genexpressionsänderung ausgewählter kataboler Zytokine ..... - 63 -
5 Diskussion ..... - 65 -
5.1 Der Einfluss von SP auf die Expression kataboler Markergene und ihre Bedeutung in der Chondrogenese und Zellvitalität ..... - 65 -
5.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von SP auf Proliferation und Zellvitalität von hMSC ..... - 67 -
5.3 Konzentrationsabhängiger Einfluss der SP-Stimulation auf die chondrogene Differenzierung von hMSC ..... - 70 -
5.4 Die konzentrationsabhängige Wirkung von αCGRP auf die Inflammation während der chondrogenen Differenzierung ..... - 72 -
5.5 Konzentrationsabhängige Rolle von αCGRP in der Zellvitalität ..... - 73 -
5.6 αCGRP als Hemmfaktor der Chondrogenese ..... - 75 -
5.7 Konzentrationsabhängige Rolle der SP- und αCGRP Stimulationen ..... - 76 -
6 Zusammenfassung ..... - 78 -
7 Abkürzungsverzeichnis ..... - 80 -
8 Literaturverzeichnis ..... - 84 -
9 Lebenslauf ..... - 93 -
10 Danksagung ..... - 94 -

1 Einleitung

1.1 Mesenchymale Stammzellen

1966 wurde erstmals über die Existenz von mesenchymalen Stammzellen (MSC, human MSC, hMSC) berichtet. Friedenstein *et al.* konnten demonstrieren, dass es im Knochenmark spezielle Zellen gibt, die sich in Osteoblasten oder Chondrozyten differenzieren können (Friedenstein et al. 1976; Friedenstein et al. 1968). In weiteren Arbeiten wurde die Existenz der hMSC bestätigt und das Vorkommen in anderen, verschiedenen Geweben wie dem Fettgewebe (Eirin et al. 2012), der Plazenta (Fukuchi et al. 2004), Zahnpulpa (Huang et al. 2009), Synovialmembran (Hermida-Gómez et al. 2011), peripheren Blut (Tondreau et al. 2005), Endometrium (Schwab et al. 2008), Nabelschnur (Baksh et al. 2007) und dem Nabelschnurblut (Sarugaser et al. 2005) nachgewiesen. Die *International Society for Cell Therapy* definierte Minimalkriterien zur Identifikation der hMSC und zur Abgrenzung der Zellen von embryonalen Stammzellen. Die hMSC müssen CD105, CD73, CD29 and CD90 als Oberflächenmarker besitzen und müssen negativ für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 sowie dem *human leukocyte antigen-antigen D relate*d (HLA-DR) Oberflächenmolekül sein. Sie sind pluripotent und zeichnen sich mit einem hohen Potential zur Proliferation aus (Dominici et al. 2006). Pittenger *et al.* gingen allerdings davon aus, dass nur etwa 0,001 –0,01 % aller kernhaltigen Zellen, z.B. im Knochenmark, mesenchymale Stammzellen sind (Pittenger et al. 1999). Sie haben die Eigenschaft, dass sie sich über einen langen Zeitraum teilen können, ohne dabei zu differenzieren (Loeffler und Potten 1997). Die meisten Gewebe im menschlichen Körper verfügen also über ein Reservoir von Stammzellpopulationen zur Regeneration nach Verletzung, Krankheit oder Alterung. Wirken nun verschiedene physiologische als auch pathologische Stimuli auf die mesenchymalen Stammzellen ein, sind sie in der Lage in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Muskelzellen oder auch Kardiomyozyten zu differenzieren (Pittenger et al. 1999, Csaki et al. 2007) (Abb. 1).

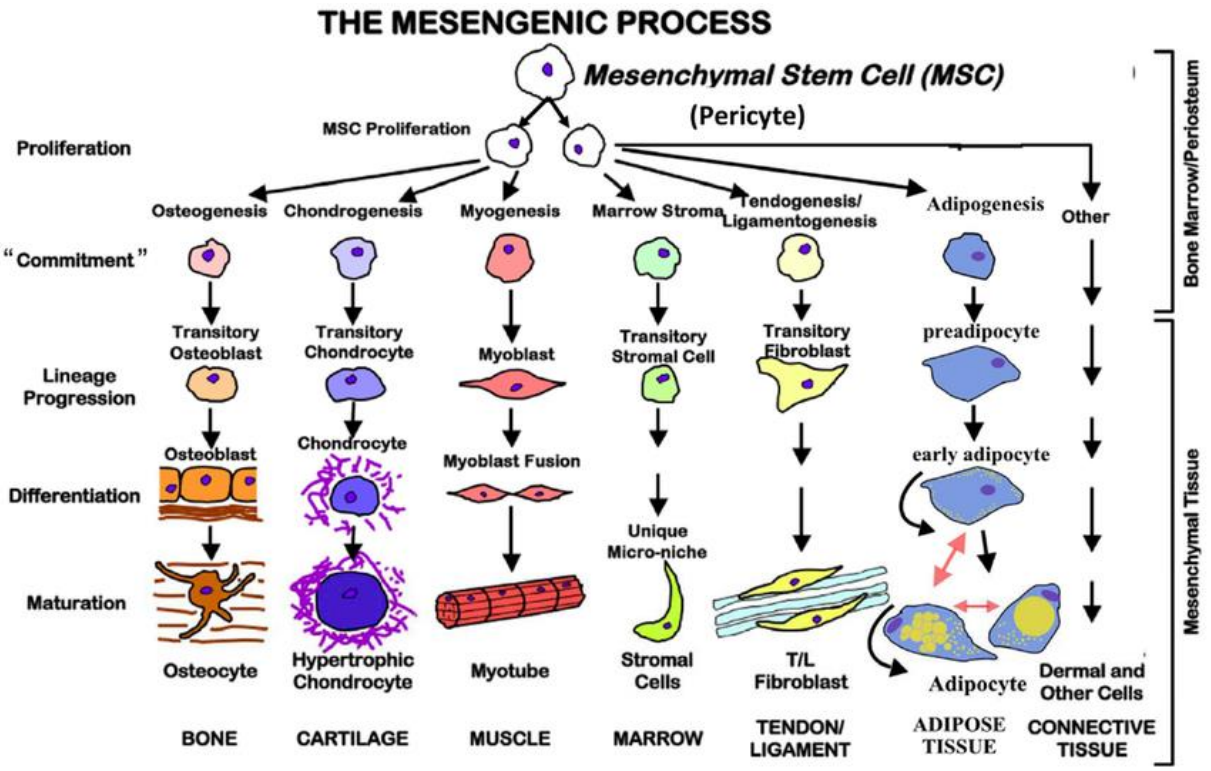


Abb. 1: Übersicht über die Differenzierungsmöglichkeiten von MSC in die verschiedenen Gewebearten, modifiziert nach Caplan *et al.* (Caplan und Dennis 2006).

Pittenger *et al.* berichteten allerdings, dass lediglich ein Drittel der MSC-Kolonien statt multipotent nur tripotent (Chondro-, Osteo-, Adipogenese) ist (Pittenger et al. 1999). Muraglia *et al.* kamen zu ähnlichen Ergebnissen, wobei die kultivierten Zellen als bipotent (Chondro-, Osteogenese) und unipotent (Osteogenese) identifiziert wurden (Muraglia et al. 2000). Ein mögliches Modell zur Erklärung dieser Beobachtung ist, dass die hMSC im Knochenmark nicht nur multipotente Stammzellen sind, sondern sich auch aus Subpopulationen von hMSC mit unterschiedlichem, bereits auf eine Zelllinie festgefahrenen Differenzierungsgrad zusammensetzen (Baksh et al. 2004).

Auf die Regulierung der Chondrogenese soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

1.2 Chondrogenese, Chondrozyten, Knorpel und chondrale Läsionen

1.2.1 Enchondrale Ossifikation

Die Chondrogenese beschreibt die Ausbildung von Knorpel während der Embryogenese. Während der Skelettentwicklung, also zum Beispiel bei der Entstehung von langen Röhrenknochen, differenzieren zunächst hMSC zu Chondrozyten. Dieser Prozess kann in verschiedene Schritte unterteilt werden. Er beginnt mit der Rekrutierung und Migration von hMSC. Die anschließende Aggregation und Kondensation zu stabilen Zellaggregaten als erste Schritte der Chondrogenese wurde bereits 1925 von Fell *et al.* beschrieben (Fell *et al.* 1925). Die Ausbildung von Gap Junctions sowie Veränderungen im Zytoskelett bilden die wichtigsten Aspekte in diesem Abschnitt der Chondrogenese. Die Zellen exprimieren in

dieser Phase vor allem noch Kollagen I, III und Hyaluronan (Linsenmayer et al. 1973; Goldring et al. 2006). Anschließend erfolgt die Kondensation der Zellen. Die Kondensation wird vor allem durch die Hyaluronidase-Aktivität und die Zelladhäsionsmoleküle neural cadherin (N-cadherin) und neural cell adhesion molecule (N-CAM) gesteuert. Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM), wie zum Beispiel Tenascin C und cartilage oligomeric protein (COMP) interagieren mit den Zelladhäsionsmolekülen und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für diesen Prozess (Hall und Miyake 1992).

Die Kondensation der Zellen und Differenzierung der Vorstufen zu Chondrozyten stehen unter der Kontrolle verschiedener Wachstums- und Differenzierungsmoleküle, wie zum Beispiel Moleküle der transforming growth factor (TGF), bone morphogenic protein (BMP)- und fibroblastic growth factor (FGF) –Familie (Hill et al. 1992; Coffin et al. 1995; Loeser et al. 2005, Solchaga et al. 2005).

Zellen im Inneren dieses kondensierenden Aggregats beginnen zu differenzieren und bilden eine Knorpelmatrix bestehend aus Kollagen II, Kollagen IX, Kollagen XI und Aggrecan.

Die Expression dieser Moleküle wird von einem für die Chondrogenese maßgeblichen Transkriptionsfaktor, dem SRY-Box Transcription Factor 9 (SOX9), der vom gleichnamigen Gen auf Chromosom 17 exprimiert wird, vorangetrieben (Bell et al. 1997, Bi et al. 1999). SOX9 kann mit seinen Kofaktoren Sox5 und Sox6 (Sox-Trio) im Promotorbereich bestimmter Zielgene, wie zum Beispiel COL2A1, binden. So kann die transkriptionelle Aktivität von SOX9 potenziert werden (Akiyama und Lefebvre 2011).

Im weiteren Verlauf der chondrogenen Differenzierung beginnen die Zellen im Zellaggregat zu proliferieren, Matrix zu bilden und aufzubauen. Dieser innere Bereich wird als Anlage bezeichnet und bildet die Vorlage für die spätere Knochenbildung in den langen Röhrenknochen (siehe Abb. 2).

Die äußeren Zellen im Bereich des späteren Perichondriums sind dadurch gekennzeichnet, dass die SOX9 Expression inhibiert wird.

Nachdem sich die Knorpelzellen im Inneren zu Säulen angeordnet haben, verändern sie sich morphologisch. Durch das Zusammenspiel von FGFs, BMPs, Parathyreoid Hormone related Peptide/Indian Hedgehog (PTHrP/Ihh) und dem Wnt-Signalweg (Wingless and Int-1) flachen sich die kugeligen Zellen immer mehr ab und stellen die Proliferation ein (Goldring et al. 2006). Diese prähypertrophen Chondrozyten sind jedoch noch nicht terminal differenziert.

Den Prozess der Entwicklung langer Röhrenknochen aus einer knorpeligen Anlage wird enchondrale Ossifikation genannt. Hierbei durchlaufen die Zellen den Prozess der terminalen Differenzierung. Ein hypertropher Phänotyp, der mit einer bis zu 20-fachen Zellvolumenzunahme gekennzeichnet ist, wird ausgebildet. Das Abschalten der SOX9 Expression ist die Voraussetzung für diese Vorgänge. Hypertrophe Chondrozyten zeichnen sich durch die vermehrte Expression von Kollagen X aus. Im Verlauf der enchondralen

Ossifikation kommt es allerdings zur Apoptoseinduktion und letztendlich den Abbau durch Chondroklasten. Durch die vaskuläre Invasion des Perichondriums und der hypertrophen Zone, dringen nun auch Osteoblasten in die hypertrophe Knorpelzone ein und initiieren die Mineralisierung/Kalzifikation der EZM. Getriggert wird dies über den vascular endothelial growth factor (VEGF) und seinen Rezeptor. Diese werden benötigt um den hypoxischen und nicht-vaskularisierten Knorpel zu Knochen umzubauen (Onyekwelu et al. 2009, Magne et al. 2005, Colnot et al. 2004) (Abb. 2).

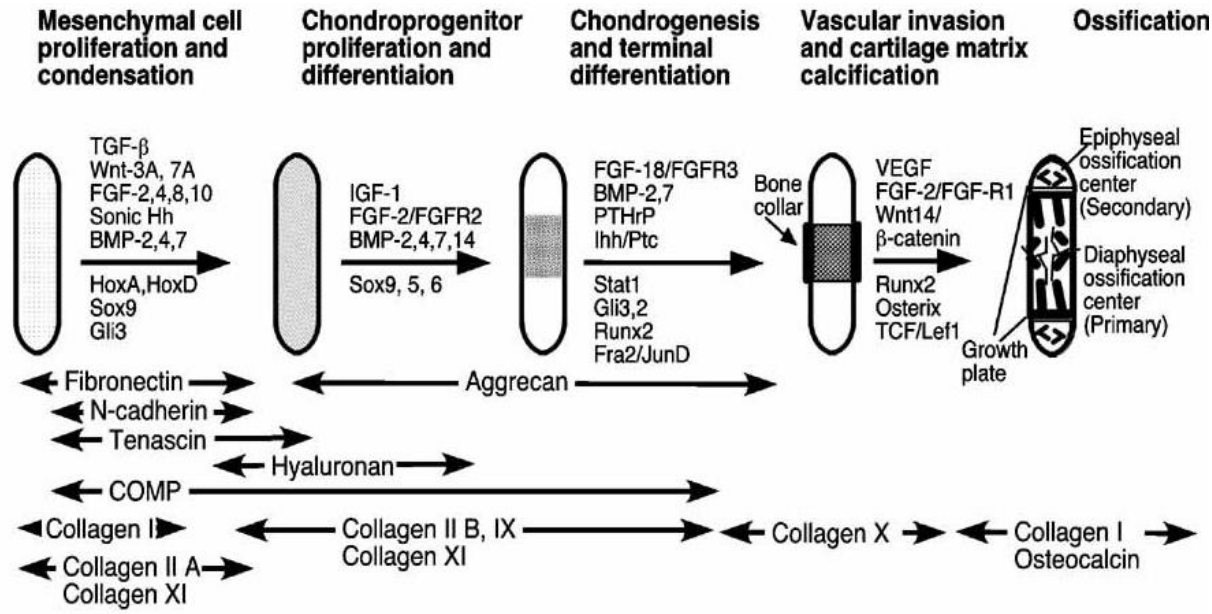


Abb. 2: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten während der Entstehung eines Röhrenknochens. Die wichtigsten Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren sind oberhalb und unterhalb der Pfeile aufgelistet, die zwischen den Röhrenknochen skizziert sind. Typische Matrixproteine werden unterhalb aufgeführt. Nach Rekrutierung, Migration, Aggregatbildung und Kondensation von hMSC kommt es zur Differenzierung in Chondrozyten. Diese unterlaufen den Prozess der Hypertrophie, wobei sie in einem nächsten Schritt im primären Ossifikationszentrum durch Chondroklasten abgebaut werden und nach vaskulärer Invasion durch Osteoblasten ersetzt werden. Anschließend erfolgt die Mineralisierung der EZM. Abbildung modifiziert aus (Goldring et al. 2006).

An den epiphysären Enden der langen Röhrenknochen entstehen sekundäre Ossifikationszentren. Unterhalb dieser, in Richtung des primären Ossifikationszentrums, befinden sich die Wachstumsfugen (Epiphysenfugen, growth plates). Hier findet das Längenwachstum der Röhrenknochen statt, bis sie beim Menschen im Laufe der Pubertät verknöchern.

1.2.2 Morphologischer Aufbau der Wachstumsfuge und Aufbau der EZM

Innerhalb der Wachstumsfuge können vier morphologisch verschiedene Zonen unterschieden werden.

Die Reservezone, die erste Schicht unterhalb der Epiphyse, besteht aus kugeligen, ruhenden Chondrozyten und sorgt für den zellulären Nachschub. Zellen beginnen zu

proliferieren und ordnen sich dabei in säulenähnliche Gebilde an, die orthogonal zur longitudinalen Achse des Röhrenknochens stehen. Die Chondrozyten der darunter liegenden prähypertrophen Zone beenden die Proliferation und beginnen zu hypertrophieren. In der hypertrophen Zone nehmen die Zellen an Zellvolumen zu, bauen vermehrt EZM auf und exprimieren Kollagen X, Matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) und IHH (indian hedgehog). Mit Voranschreiten der Matrixmineralisierung verschmelzen die Epiphysenfuge und der kalzifizierte Bereich des primären Ossifikationszentrums (Abb. 3).

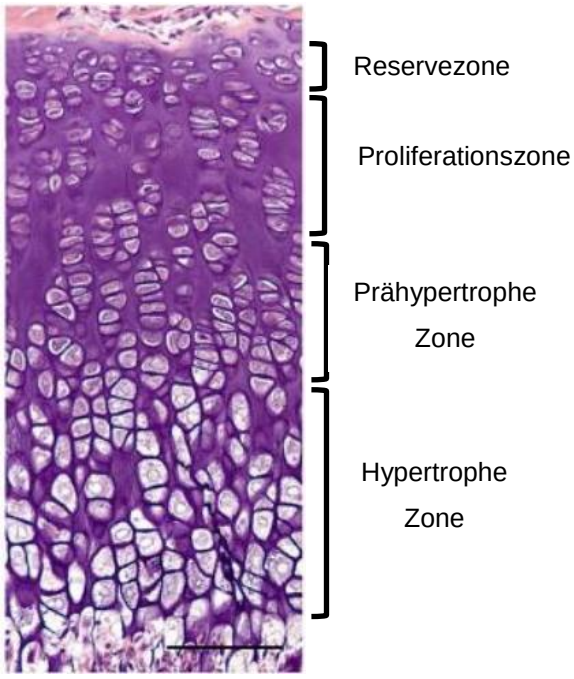


Abb. 3: Wachstumsfuge einer 4 Wochen alten Maus. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Die Wachstumsfuge ist für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich. Sie ist gekennzeichnet durch verschiedene morphologisch unterscheidbare Zonen: Von der Epiphyse ausgehend: Reservezone, Proliferationszone, Prähypertrophe Zone und anschließend an die Diaphyse angrenzend die hypertrophe Zone. (Balken = 100 µm). Abbildung modifiziert nach (Usami et al. 2016).

Die EZM beinhaltet drei Klassen von Proteinen: Kollagene, große Proteoglykane und andere Nicht-Kollagen-Proteine, wie das link protein, Fibronectin, COMP, und kleinere Proteoglykane wie Biglycan, Decorin und Fibromodulin (Chen et al. 2006) (Abb.4).

Das Kollagennetzwerk, mit der volumenmäßigen Hauptkomponente Kollagen II, zeichnet sich durch eine besondere Zugelastizität aus. Eine weitere besondere biomechanische Eigenschaft des Knorpels ist die Druckelastizität. Sie ermöglicht es Druck aufzunehmen, sich zu verformen und nach Entlastung wieder in seine ursprüngliche Form zurückzukehren. Diese Eigenschaft wird von den extrafibrillären Bestandteilen, den Proteoglykanen, gewährleistet (Lüllmann-Rauch 2003).

Der Knorpel enthält verschiedene Kollagen Typen, die alle eine spezielle Funktion und Lokalisation aufweisen. Das Baumerkmal aller Kollagene ist die sogenannte Tripelhelix.

Dabei winden sich drei α-Helices unter Bildung einer Superhelix umeinander. Die Kollagenmoleküle können sich anschließend zu einer Kollagenfibrille vereinen, indem sie sich jeweils um ein Viertel der Länge einer Fibrille versetzt aneinanderlagern. Die Quervernetzung untereinander ist vom Lysin- und Hydroxylysinanteil der Kollagenmoleküle abhängig (Lüllmann-Rauch 2003).

Die häufigsten Kollagene, die im Knorpel vorkommen, sind Kollagen II, VI, IX und XI. Kollagen II ist mit einem Anteil von etwa 80% das am häufigsten synthetisierte Kollagen im hyalinen Knorpel (Gelse et al. 2003) und mit einem Anteil von 90-95% die grundlegende Komponente der Makrofibrillen des hyalinen Knorpels (Bhosale und Richardson 2008). Kollagen II ist ein fibrilläres Kollagen das aus drei identischen alpha1-Ketten besteht, die durch das COL2A1 Gen exprimiert werden. Das Gen befindet sich auf Chromosom 12q12-q13.2 (Gelse et al. 2003) und ist als typisches Protein des hyalinen Knorpels als Marker geeignet.

Ein anderer spezieller Kollagen Typ und für diese Arbeit von besonderer Bedeutung, ist Kollagen X. Es handelt sich hierbei um ein nicht-fibrilläres Kollagen, das vor allem von hypertrophen Chondrozyten gebildet wird. Diese sezernieren zu 45% Kollagen vom Typ X (Shen 2005). Kollagen X wird durch das COL10A1-Gen an Lokus Chromosom 6q21-q22 exprimiert und besteht aus 3 identischen alpha1-Proteinketten (Gelse et al. 2003).

Proteoglykane sind Proteine, an denen kovalent Glykosaminoglykanketten (GAG) gebunden sind. Hier sind die GAG zu langen Ketten aus Disaccharid-Einheiten verbunden. Die meisten GAG sind sulfatiert und tragen Negativladungen, durch die sie eine große Wasserbindekapazität erlangen. Sie können somit einen hohen osmotischen Druck erzeugen, der von dem Kollagennetzwerk stabilisiert wird. Die häufigsten GAG im Knorpel sind Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Lagern sich bis zu 100 Ketten dieser GAG und ein Core-Protein zusammen, entsteht daraus Aggrecan, dem am häufigsten vorkommenden Proteoglykan des Knorpels (Lüllmann-Rauch 2003). Die GAG unterliegen vor allem bei mechanischen Stimuli einem ständigen Umbau. Allerdings nimmt die Fähigkeit zum Umbau im Alter und bei pathologischen Verhältnissen wie in der Osteoarthrose (OA) ab (Welsch 2010).

Hyaluronsäure, ein nicht-sulfatiertes GAG, hat neben der Fähigkeit große Mengen an Wasser zu binden eine weitere besondere Aufgabe: Mit Hilfe von Linker-Proteinen stellt es eine Verbindung zwischen den Proteoglykanen und den Kollagenfibrillen der EZM her, wodurch die EZM stabilisiert wird.

Chondrozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche Transmembranrezeptoren, die Integrine (α1β1, α2β1, α10β, α11β1), welche Kollagene und Fibronectin binden und so wichtige Zell-Matrix-Adhäsionen ausbilden können (Loeser 2014) (Abb. 4).

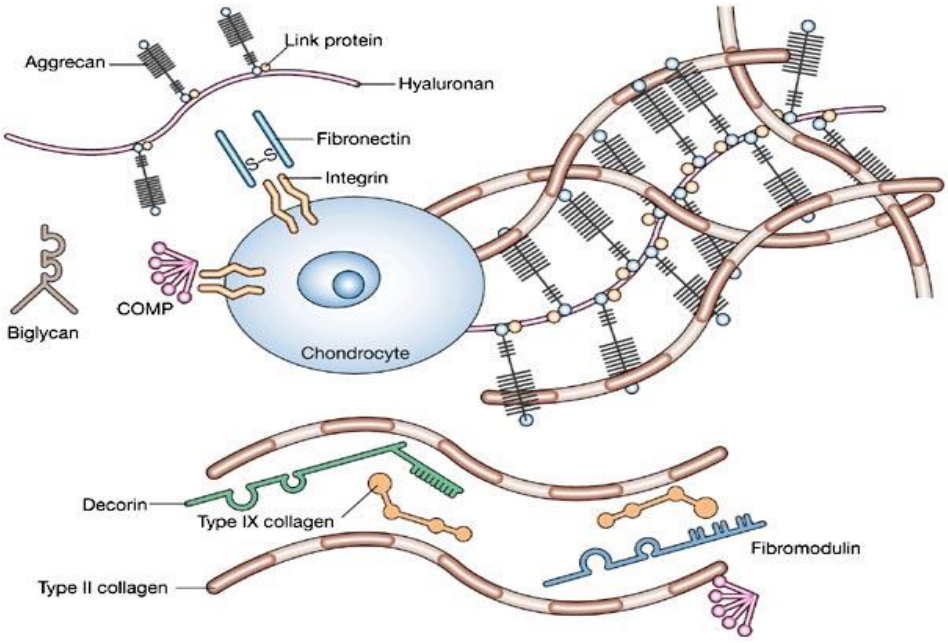


Abb. 4: Vereinfachter Aufbau der EZM des hyalinen Knorpels. Chondrozyten bilden die einzige zelluläre Komponente. Sie sind umgeben von EZM, mit den Proteoglykanen und Kollagenen als hauptsächliche Makromoleküle. Durch das Zusammenspiel vieler kleiner Moleküle, wie COMP, Fibronectin, Decorin und Biglykan mit den Komplexen aus Hyaluronan, Aggrecan und Kollagenen wird die EZM aufgebaut und stabilisiert. Modifizierte Abbildung aus (Chen et al. 2006)

1.2.3 Hyaliner Knorpel

Der hyaline Knorpel ist druckelastisch und besteht aus Chondrozyten, die in Gruppen in der EZM organisiert sind.

Gegensätzlich zu den Prozessen in der Wachstumsfuge entwickeln sich Chondrozyten im artikulären Knorpel nicht weiter zu hypertrophen Chondrozyten, sondern haben einen stabilen chondrogenen Phänotyp. Die Chondrozyten im artikulären Knorpel machen nur 3-5 % des EZM Volumens aus und sind verantwortlich für den Auf- und Abbau der EZM. Die EZM wird im Bereich der Chondrozytengruppen „Territorium“ und zwischen den benachbarten Gruppen „Interterritorium“ genannt. Im Interterritorium besteht das Kollagennetzwerk aus Kollagen II, IX, XI während im Bereich des Territoriums, das für die perizelluläre Matrix spezifische nicht-fibrilläre Kollagen VI vorhanden ist (Goldring et al. 2006).

Der artikuläre Knorpel wird in vier verschiedene tangentiale Zonen unterteilt. In Zone I (Tangentialzone) liegen spindelförmig angeordnete Chondrozyten, deren Kollagengehalt hoch und der Proteoglykangehalt niedrig ist (Bruns und Steinhagen 1999). Zone I bildet die oberste Schicht des Gelenkknorpels, hier verlaufen die Kollagenfasern tangential. Die Chondrozyten der Zone I bilden Lubricin. Mit Hyaluronan zusammen bildet es eine besondere makroskopisch glatte Schicht an der Knorpeloberfläche (Greene et al. 2011).

Die Chondrozyten runden sich in Zone II (Übergangszone) zunehmend ab, der Proteoglykangehalt steigt hier an. Die Kollagenfasern verlaufen in dieser Zone zunehmend

schräg und hier findet man typischerweise Dekorin und Kollagen Typ VI. In der dritten Zone, der breiten Radiärzone, liegen die Zellen säulenartig angeordnet, der Proteoglykangehalt ist am höchsten, der Wassergehalt am niedrigsten. In Zone IV, der Mineralisierungszone, findet man Kalziumkristalle in der Knorpelmatrix. Es bildet die kalzifizierte Übergangszone vom hyalinen Knorpel zum subchondralen Knochen (Abb. 5). Zwischen Zone III und IV liegt die sogenannte *Tidemark*, eine subchondrale Lamelle (Rudert und Wirth 1998).
Die besonderen Eigenschaften des Gelenkknorpels sind u.a. auf die arkadenartige Anordnung der Kollagenfibrillen zurückzuführen, die wie ein umgedrehtes "U" im subchondralen Knochen verankert sind.

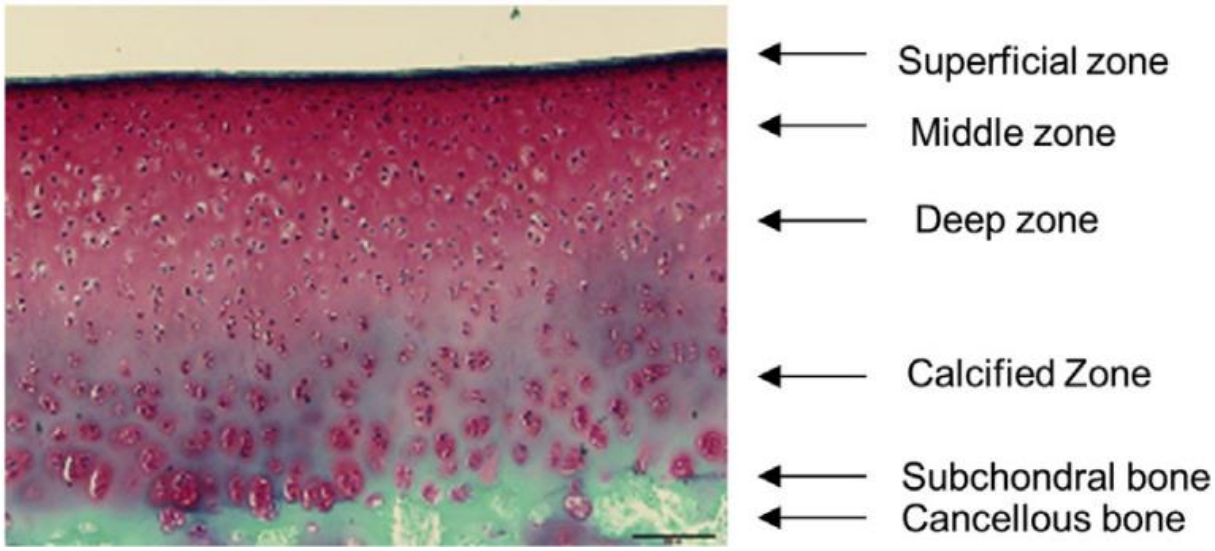


Abb 5.: Safarin O Färbung von Knorpel am distalen Schweinefemur. Mit Pfeilen wird eine Abgrenzung der verschiedenen Knorpelzonen vorgenommen. Zone I (superficial zone) bildet die oberste Schicht. Es folgt die Übergangszone (middle zone). In der dritten Zone (deep zone), der breiten Radiärzone, liegen die Zellen säulenartig angeordnet, der Proteoglykangehalt ist am höchsten, der Wassergehalt am niedrigsten. Zone IV ist die Mineralisierungszone (calcified zone), die anschließend in den subchondralen Knochen übergeht (Carballo et al. 2017).

Adulter Knorpel enthält meist keine Blutgefäße (mit Ausnahme des Kehlkopfknorpels und der Menisci) und keine Nerven. Aufgrund seines zum erheblichen Teil anaeroben Stoffwechsels, werden die Zellen durch Diffusion ernährt. Daher zählt das Knorpelgewebe auch zu den bradytrophen Gewebetypen. Durch die sehr geringe Zellteilungsrate, weist der Knorpel somit auch eine stark verminderte Regenerationsfähigkeit auf, wodurch sich teilweise die schlechte Selbstheilungstendenz bei Knorpelverletzungen erklären lässt (Beneke et al. 1966). Knorpeldefekte, die größer als 5 mm^2 sind, werden nicht spontan regeneriert (Mitchell und Shepard 1987).

1.2.4 Chondrale und osteochondrale Läsionen

Chondrale und osteochondrale Läsionen von Gelenken sind typische Krankheitsbilder in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Nur bei sehr kleinen Läsionen der Matrixkomponenten ohne Schädigung der Grundstruktur des Knorpels sind die Chondrozyten in der Lage über eine Neusynthese von Proteoglykanen den Knorpeldefekt ausreichend zu regenerieren (Buckwalter und Mankin 1998).

Für die Behandlung größerer Läsionen stehen verschiedene chirurgische knorpelregenerative Verfahren zur Verfügung.

Ist der darunterliegende subchondrale Knochen noch nicht betroffen, gibt es die Möglichkeiten der sogenannten Oberflächenversiegelung des Knorpels durch Debridement oder der Knorpelglättung mittels Plasmafrequenzablation, was zu einer Diffusionsbarriere zwischen Knorpel und Knochen führt (Spahn 2007).

Wakitani *et al.* beobachteten, dass Knorpeldefekte bei gleichzeitiger knöcherner Beteiligung bessere Heilungstendenzen zeigten (Wakitani et al. 1994). Hieraus entwickelte sich der Ansatz, dass Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zu einer Knorpelregeneration führen könnte (Vogt et al. 2007). Daher beruht das Prinzip der regenerativen Verfahren auf der Freilegung des subchondralen Knochens und Eröffnung des Markraumes und der damit verbundenen Freisetzung multipotenter Stammzellen. Bekannte Verfahren sind hierbei die Pridie-Bohrung, die Abrasionsarthroplastik und die Mikrofrakturierung (Karuppal 2017, Frisbie et al. 1999). Die Qualität dieses Knorpels erfüllt aber nicht die des ursprünglichen hyalinen Knorpels, sondern hat eher fibrillären Charakter (Vogt et al. 2007).

Weitere Therapieoptionen liefern die sogenannten Knorpelersatzverfahren, wie das osteochondrale autologe Knorpel-Knochen-Transplantations-System (OATS) und autologe Chondrozytentransplantation (ACT).

Bei der OATS handelt es sich um einen Transfer von Knochen-Knorpelzylindern von einem minderbelasteten Bereich des Gelenks in den Defektbereich. Hierbei konnte eine Verbesserung der Beschwerden nur über wenige Jahre hinweg erzielt werden, was auf die entstehende Inkongruenz durch das Transplantat zurückgeführt wird (Vogt et al. 2007). Bei dem Verfahren der Autologen Chondrozytenimplantation handelt es sich um eine Methode, bei der vollschichtige Knorpeldefekte wieder hergestellt werden sollen (Vogt et al. 2007). In einer ersten Sitzung wird dabei dem Patienten Knorpel aus einem nicht oder minderbelasteten Anteil des betroffenen Gelenks entnommen. Beim Kniegelenk handelt es sich meist um die patellofemoral Region. Nach Isolation der Chondrozyten vom Präparat werden die Zellen in einer Monolayerkultur 2-3 Wochen kultiviert. Nach Erreichen der notwendigen Zellzahl findet eine Übertragung in die Defektzone in einer zweiten Sitzung statt. Meist werden die Zellen, zuvor in einer Matrix eingebettet, in das Gelenk eingebracht

und per Naht oder mittels Fibrinkleber befestigt, was eine gleichmäßige Verteilung und Ortsgebundenheit gewährt (Rudert und Wirth 1998, Brittberg et al. 1994).
Grifka *et al.* konnte in einer Studie zeigen, dass sich in einem Zeitraum von 2-10 Jahren das klinische Bild in 70-96% der Fälle deutlich verbessert (Grifka et al. 2000), aber dennoch der entstehende Knorpel histologisch betrachtet eher als knorpelähnliches Weichteilersatzgewebe zu werten ist (Martinek et al. 2003).

1.3 Osteoarthrose

Osteoarthrose (OA) ist die häufigste degenerative Gelenkerkrankung und die Hauptursache für Gelenkschmerzen im Alter. Sie wird begleitet von zunehmender Funktionseinschränkung und Deformierung des betroffenen Gelenks und hohem Leidensdruck für die Erkrankten (Loeser et al. 2012). Bereits 2012 stellten Loeser *et al.* fest, dass Osteoarthrose nicht nur ein simpler Prozess der Abnutzung ist, sondern als fehlerhaftes *Remodeling* des Gelenkgewebes verstanden werden muss (Loeser et al. 2012). Es ist eine Erkrankung des gesamten Gelenkes, das bedeutet nicht nur der hyaline Knorpel ist betroffen, sondern auch der subchondrale Knochen, Bänder, Kapsel, Synovium und die periartikulären Muskeln (Martel-Pelletier et al. 2016; Brandt et al. 2006). Es findet ein pathophysiologischer Umbau der verschiedenen Gewebetypen statt. Dieser wird durch eine entzündliche Komponente verstärkt, indem Chondrozyten, Synovialzellen und Zellen des subchondralen Knochens vermehrt proinflammatorische Mediatoren, Zytokine und Chemokine produzieren.
Fokale Traumata können unbehandelt zu OA führen. Weitere Risikofaktoren für OA sind zunehmendes Alter, weibliches Geschlecht, Übergewicht, familiäre Häufungen, mechanische Faktoren, insbesondere eine Fehlstellung des Gelenks oder eine Bandinstabilität (Palazzo et al. 2016).
OA wird in der klinischen Diagnostik definiert als ein Komplex an Veränderungen, die man vor allem in bildgebenden Verfahren erkennen kann. Dazu gehören der Verlust des hyalinen Knorpels, die subchondrale Sklerosierung, die Bildung von osteophytären Anbauten, die Entzündung der Synovialmembran, sowie die Degradation von Bändern und Menisken.
Zu Beginn bilden sich vor allem kleinere Fissuren in der oberflächlichen Knorpelschicht, die sich im Verlauf bis in die kalzifizierte Region des Knorpels ausweiten und zu veränderten Interaktionen zwischen Chondrozyten und der EZM führen. Durch die eigenen Reparaturmechanismen des Körpers steigern die Chondrozyten ihre eigene Produktionsaktivität. Der vor allem in frühen OA-Stadien charakteristische Proteoglykanverlust soll so kompensiert werden. Allerdings werden dadurch auch vermehrt proinflammatorische Zytokine (Interleukin 1β (IL1β), IL6, IL8, tumor necrosis factor alpha (TNFα)) und matrixabbauende Proteine freigesetzt (Aggrecanasen, MMP-3 und -13) (Goldring und Goldring 2010). Diese wiederum wirken auf die umgebende und angrenzende

Synovialmembran stimulierend und bewirken ebenfalls eine gesteigerte Ausschüttung von proinflammatorischen Molekülen.

Diese entzündlichen Prozesse können auch durch fokale Traumata, wie durch einen Riss des vorderen Kreuzbandes, oder Verletzung der Menisci, induziert werden. In der Folge werden proinflammatorische Mediatoren verstärkt produziert, es kommt zur zellulären Einwanderungen der Entzündungszellen ins Gelenk und Signalwege, die eine proinflammatorische Wirkung verstärken, werden aktiviert (Lieberthal et al. 2015).

Dieses veränderte Milieu bewirkt eine synoviale Gewebshyperplasie, führt zu hypertrophen Veränderungen der Chondrozyten und verstärktem Nachweis von Kollagen X und zur gesteigerten Durchblutung. Obwohl Knorpel primär ein avaskuläres Gewebe ist, kommt es im Prozess der Arthrose allerdings zum Einwachsen von Blutgefäßen in bestimmte Knorpelschichten. Eine wichtige Rolle soll hierbei VEGF spielen. Die Gefäße dringen vom subchondralen Knochen in den kalzifizierten Knorpel ein und durchbrechen teilweise die *Tidemark*. Die *Tidemark* ist eine dünne Linie, die sich nach einer Hämatoxylin Färbung als Mineralisationslinie zwischen dem kalzifiziertem und nicht-kalzifizierten Gelenkknorpel darstellt (Lane et al. 1977). Diese vaskuläre Invasion spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung der Osteophyten und subchondralen Zysten (Glyn-Jones et al. 2015) (Abb. 6).

Die OARSI (Osteoarthritis Research Society International) definierte verschiedene Richtlinien anhand histopathologischer Veränderungen um die osteoarthrotische Veränderungen nach Schweregrad einteilen zu können. Die Autoren Glasson et al. trafen einige Modifizierungen, sodass insgesamt 6 Stadien unterschieden werden können (Glasson et al. 2010).

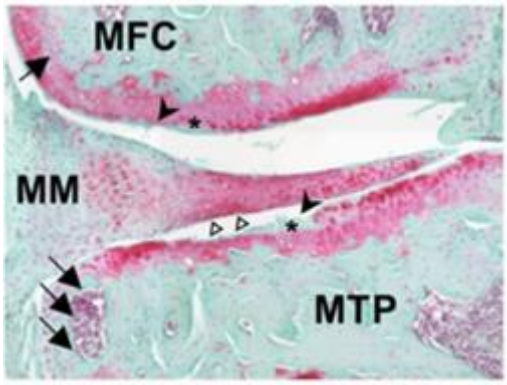


Abb. 6: Safarin-O-Färbung eines murinen Kniegelenks, 12 Wochen nach Arthroseinduktion mittels Destabilisierung des medialen Mensikus. Die histopathologischen Veränderungen des Knorpels des medialen Tibiaplateaus (MTP) und der medialen Femurkondyle (MFC) wurden nach den Richtlinien der OARSI bewertet. MM ist der mediale Meniskus. Durch den Verlust an Proteoglykanen kann eine Erblassung der Knorpeloberfläche abgebildet werden (*). Volle Pfeile (→) markieren den Bereich der Osteophytenbildung, Pfeilköpfe (▸) zeigen auf Areale mit irregulärer Knorpeloberfläche und freie Dreiecke (Δ) zeigen auf Knorpelfissuren, die sich bis zur Mineralisierungszone erstrecken. Modifizierte Abbildung aus (Muschter et al. 2020).

„Der hyaline Knorpel heilt nicht“. An dieser bereits 1742 getroffenen Feststellung des schottischen Anatomen William Hunter hat sich bis heute nichts geändert.
Leichte Formen der Arthrose im Anfangsstadium können zunächst konservativ mit nicht-pharmakologischen und pharmakologischen Maßnahmen behandelt werden. Hierzu zählen unter anderem Änderungen der Lebensgewohnheiten mit Gewichtsreduktion und regelmäßiger Bewegung sowie die physikalische Therapie, Physiotherapie, Akkupunktur sowie die Verschreibung von diversen Hilfsmitteln zur Gelenkentlastung (Waller et al. 2011; Diehl et al. 2013).
Der Einsatz von Analgetika, insbesondere den selektiven Inhibitoren der Cyclooxygenase 1 und 2, sind nach aktueller Studienlage der Therapie mit nicht-selektiven Analgetika in Hinsicht der Schmerzlinderung und Reduktion der Funktionseinschränkung der alleinigen Schmerztherapie mit Paracetamol überlegen. Ferner bieten manche nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) neben der oralen Einnahme auch noch die Möglichkeit der topischen Anwendung, wodurch systemische Wirkungen und Nebenwirkungen vermieden werden (Felson 2009).
Im weiteren Fortschreiten der Erkrankung ist eine konservative Therapie alleine meist nicht mehr ausreichend. Der endoprothethische Gelenkersatz stellt die ultimo ratio dar. Es gibt jedoch keinen national oder international akzeptierten Konsens zur genauen Indikationsstellung beziehungsweise zum optimalen Zeitpunkt für den Eingriff. Allerdings formulierten die Autoren Haase *et al.* 2015 sogenannte Mindestkriterien, nach ihrer Evidenz und Konsens basierten Meinung.
Diese kamen überein, dass der Nachweis eines Strukturschadens, Versagen konservativer Therapiemaßnahmen, eine auf die Kniegelenkerkrankung bezogene Einschränkung der Lebensqualität, Schmerzen sowie ein auf die Gelenkerkrankung bezogener subjektiver Leidensdruck als wichtige Kriterien vorliegen sollten (Haase et al. 2015).

1.4 Zellzyklus

Der Zellzyklus stellt eine periodische Abfolge von Phasen dar, die die Reproduktion von Zellen steuert und koordiniert. Besonders bei Stammzellen ist die Kontrolle des Zellzykluses wichtig, da sich diese regelmäßig teilen und entweder neue Stammzellen gebildet werden oder ausdifferenzieren. Es gibt zwei verschiedene Phasen: die Interphase, die der Verdopplung der Erbinformation dient, und die Mitose, in der sich die Zelle teilt. Aus einer Zelle entstehen zwei identische Tochterzellen (Lüllmann-Rauch 2003).
Die Interphase lässt sich noch weiter unterscheiden. In der G_1-Phase werden Proteine und Organellen synthetisiert und die Zelle wächst dabei auf die Größe der Mutterzelle heran. Bestimmte Wachstumsfaktoren und auch Faktoren wie Zellgröße oder Energievorrat stimulieren die Zelle dazu, in die S-Phase einzutreten. Sind die Bedingungen erfüllt, wird in

der S-Phase das Chromatin verdoppelt. Dazu wird der Doppelstrang geöffnet, wobei unter anderem DNA-Helikasen und DNA-Einzelstrang-Bindungsproteine eine Rolle spielen. Zudem werden Proteine, die für die Verpackung der DNA benötigt werden (insb. Histonproteine) synthetisiert (Welsch 2010). In der folgenden G2-Phase werden die Vorbereitungen für die nächste Zellteilung getroffen und Replikationsfehler repariert. Kommt es zur Differenzierung der Zellen, so treten sie aus der G1-Phase in die G0-Phase ein, bleiben vital und betreiben Stoffwechsel, teilen sich aber nicht (Baron et al 2012).

Den zeitlichen Ablauf und das korrekte Einsetzen der einzelnen Zellzyklusphasen werden von einem komplexen Kontrollsystem überwacht.

An verschiedenen Stellen im Zellzyklus gibt es definierte Kontroll- und Übergangspunkte. Im Falle eines Fehlers in der DNA kann der Zellzyklus an dieser Stelle gestoppt werden, um Reparaturen vorzunehmen. Gelingt dies nicht, wird die Apoptose eingeleitet.

An den Kontroll- und Übergangspunkten aktivieren Cycline die sog. Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDK). Die Cycline bilden hierbei den limitierenden Faktor, da sie einem ständigen Auf- und Abbau während des Zellzykluses unterlegen sind.

CDK ändern ihre Aktivität im Verlauf der Zellzyklusphasen je nach ihrem Phosphorylierungsstatus. Die CDK gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen, die Cycline als regulatorische Untereinheiten binden können. Durch die Bildung von CDK/Cyclin-Komplexen werden wesentliche Änderungen (Phosphorylierung) in der CDK-Struktur induziert, was die Kinasen aktiviert (Heinrich et al. 2014).

Es lassen sich verschiedene Cycline unterscheiden, wie Cyclin D, Cyclin E, Cyclin A und Cyclin B. Cyclin A führt die Zelle in die G2 Phase und Cyclin B ist für die Einleitung der Mitose wichtig (Welsch 2010).

Das wichtigste Cyclin für den G1/S-Übergang ist das Cyclin D1. Cyclin D1 wird während des kompletten Zellzyklus exprimiert, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen. In der G1 Phase bildet es zusammen mit seinen Bindungspartnern CDK4 und CDK 6 einen Komplex, der durch Phosphorylierung und Inaktivierung des Retinoblastomproteins, E2F freisetzt und den Übergang von der G1 in die S-Phase ermöglicht. CDK können von sog. Inhibitorproteinen (CDK-Inhibitoren, CKI) in ihrer Aktivität gehemmt werden, indem sie mit verschiedenen Cyclin-CDKs Komplexe bilden und somit verschiedene Möglichkeiten haben den Zellzyklus zu regulieren. INK4 und Cip/Kip sind die zwei unterschiedlichen Familien der CKIs (Lim und Kaldis 2013) (Abb. 7).

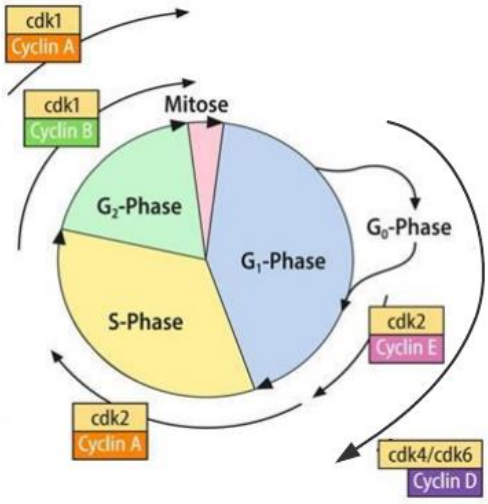


Abb. 7: Überblick über das Zusammenwirken von Cyclinen und Cylin-abhängigen Kinasen während des Zellzykluses. Einzelne Cycline können mit verschiedenen Cdks und einzelne Cdks mit verschiedenen Cyclinen interagieren. Modifizierte Abbildung aus (Heinrich et al. 2014).

1.5 Das sensible Nervensystem- Substanz P und αCGRP

Das Nervensystem kann sowohl morphologisch als auch funktionell im Aufbau unterschieden werden. Während morphologisch zwischen einem zentralen (Gehirn und Rückenmark) und peripheren Nervensystem (alle Nerven und Nervenfaserbündel, die die Sinnesorgane (z.B. Auge) mit den Erfolgsorganen (z.B. Muskel) verbindet) unterschieden wird, lässt es sich funktionell in ein somatisches und ein vegetatives Nervensystem unterteilen. Das somatische Nervensystem umfasst sowohl sensorische als auch sensible Nervenfasern. Diese nehmen afferent Reize auf und leiten diese an das ZNS weiter (Lüllmann Rauch 2003).

Das autonome Nervensystem, bestehend aus dem sympathischen und parasympathischen Nervensystem, funktioniert autonom, d.h. es entzieht sich der willkürlichen Kontrolle des Menschen und reguliert überlebenswichtige Funktionen wie Atmung und Verdauung.

Neurone sind spezialisierte Zellen, die für die Reizaufnahme über ihre dendritischen Fortsätze sowie die Weitergabe und Verarbeitung von Nervenimpulsen zuständig sind.

Der zweite charakteristische Zelltyp des Nervensystems ist die Gliazelle. Indem sie Hüllen um die langen Fortsätze der Neurone (Axone) bilden, beeinflussen sie nicht nur die Leitgeschwindigkeit, sondern tragen auch zur Regulation der Homöostase des Nervensystems bei (Welsch 2010).

Die Signaltransduktion zu anderen Zellen findet diskontinuierlich über Synapsen statt, sodass sowohl elektrische als auch chemische Prozesse an der Signaltransduktion beteiligt sind.

Neurotransmitter werden aus Vesikeln der präsynaptischen Membran ausgeschüttet und treten in den synaptischen Spalt zwischen den Nervenzellen ein. Postsynaptisch werden sie von Rezeptoren auf der Zellmembran erkannt und reversibel an diese gebunden.

Neurotransmitter können hemmende oder erregende Funktionen haben, wobei es von der postsynaptischen Rezeptor- und Ionenkanalausstattung und von den intrazellulären Signaltransduktionswege abhängt. Es gibt eine Vielzahl von Neurotransmittern. Zu ihnen gehören unter anderem zwei verschiedene nozizeptive Neuropeptidfamilien: die Tachykinine und die Calcitonin gene related peptides (CGRP) (Welsch 2010).

1.5.1 Der Neurotransmitter αCGRP

Durch das alternative Splicing der für Calcitonin kodierenden mRNA aus der Schilddrüse von Ratten, konnte die Produktion einer alternativen mRNA des CGRPs beschrieben werden (Amara et al. 1982), welche das erste Mal aus medullärem Schilddrüsenkarzinomgewebe isoliert wurde (Morris et al. 1984). CGRP gehört zu einer großen Familie von Peptiden, zu denen zum Beispiel auch Calcitonin, Amylin und Adrenomedullin gehört. Die vorherrschende Form des CGRP ist das αCGRP, ein 37 Aminosäuren langes Neuropeptid. Es ist eine zweite Isoform des CGRP bekannt, das βCGRP. Diese wird von einem separaten Gen kodiert.

Allerdings unterscheiden sich die Aminosäuren-Sequenzen der αCGRP und βCGRP in nur 3 Aminosäuren im menschlichen Körper. Beide Isoformen haben ähnliche biologische und pharmakologische Rollen. αCGRP wird sowohl im peripheren als auch zentralen Nervensystem exprimiert, während βCGRP vor allem im enterischen Nervensystem gebildet wird. CGRP entfaltet seine Wirkung über die Bindung zu CGRP1- und CGRP2-Rezeptoren (Brain 1997). Sie gehören zur Gruppe der heterodimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G-protein-coupled receptor - GPCR) und entstehen durch die Bildung eines Komplexes aus dem calcitonin receptor-like receptor (CRLR/CLR), dem *receptor activity modifing proteine 1* (RAMP1) und dem *receptor component protein* (RCP) (Abb.8).

Intrazellulär erfolgt je nach G-Protein-Subtyp die weitere Aktivierung oder Inhibierung verschiedener Signalkaskaden.

Der Subtyp G_s stimuliert die Adenylylcyclase (AC) und der second messenger cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wird vermehrt gebildet. In einem weiteren Schritt werden durch die Proteinkinase A (PKA) mehrere nachgeschaltete Proteine phosphoryliert.

G_q aktiviert die Phospholipase Cβ1, wobei Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert werden. IP3 bindet an seinen Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER), was zu einem Calciumausstrom aus dem ER ins Zytoplasma führt (McLatchie et al. 1998, Yu et al. 2009).

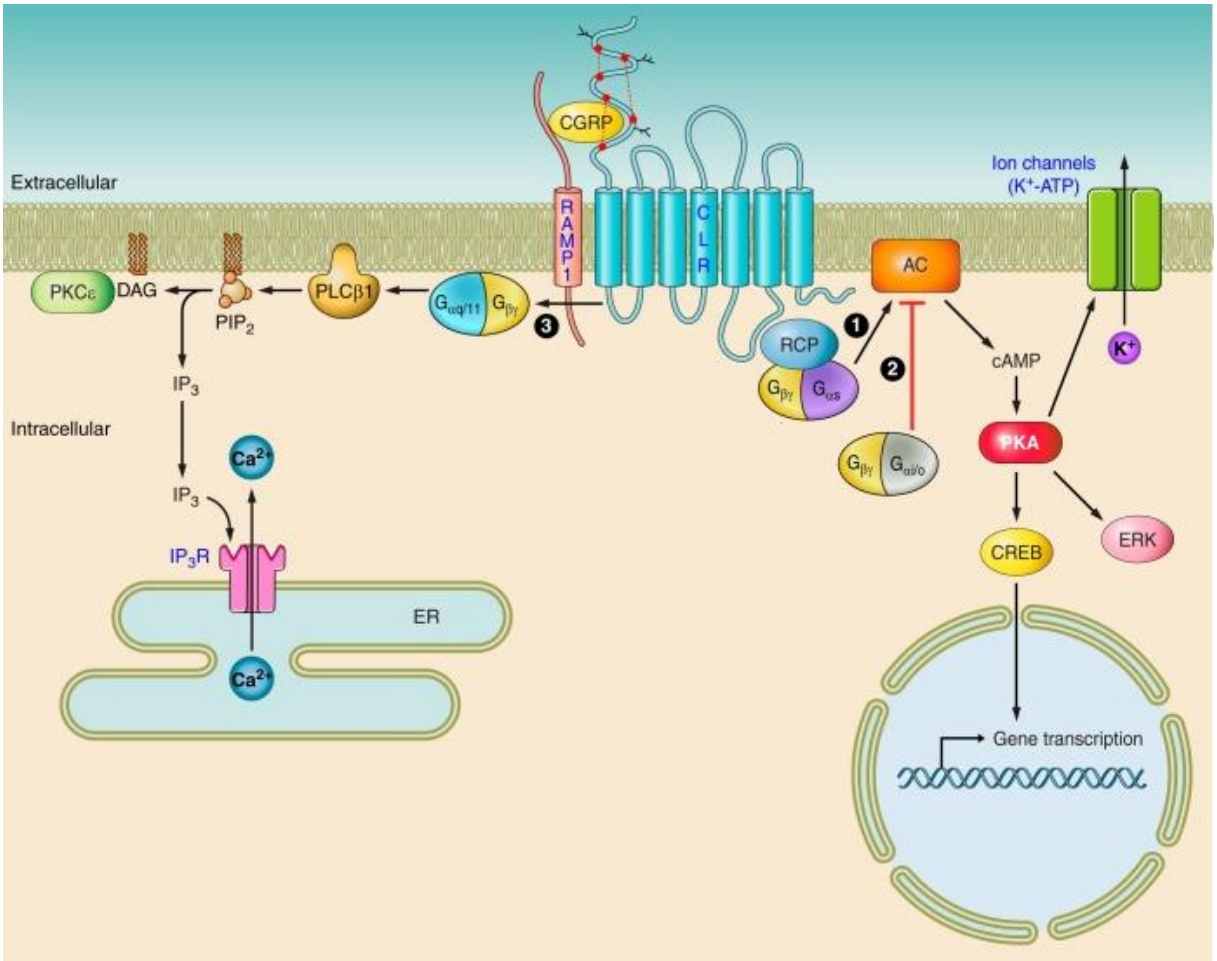


Abb. 8: Schematische Darstellung eines CGRP-Rezeptors modifiziert nach (Russell et al. 2014). Der Rezeptor besteht aus CRLR, RAMP1 und RCP.
Die Aktivierung des Rezeptors resultiert in einer Aktivierung weiterer nachgeschalteter Effektormoleküle und Signalwege.

1. Die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor kann über die α-Untereinheit des G-Proteins die AC stimulieren, wodurch die Synthese von cAMP gesteigert wird. Die so aktivierte PKA phosphoryliert nun multipel nachgeschaltete Proteine, unter anderem einem Kaliumsensitiven ATP Kanal, verschiedene extrazellulär Signal-abhängige Kinasen (ERKs), oder Transkriptionsfaktoren wie das cAMP *response element-binding protein* (CREB), was zu einer vermehrten Gentranskription führt.
2. Die α-Einheit des G-Proteins kann allerdings auch die AC inhibieren und durch verringerte PKA-Aktivität so eine Reduktion des cAMP-Levels herbeiführen.
3. Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung eines Gq-Proteins, wodurch die Phospholipase C aktiviert wird. Diese spaltet ihrerseits Phospholipide der Zellmembran in die second messenger IP3 und DAG. IP3 setzt daraufhin intrazelluläres Kalzium frei, welches zusammen mit DAG zur Aktivierung der Proteinkinase C führt. Abbildung modifiziert aus (Russell et al. 2014)

Mittels Immunofluoreszenz konnten αCGRP-haltige Nervenfasern und ihre Rezeptoren unter anderem in der Haut, Muskulatur, Synovialgewebe, kardiovaskulären System sowie in den Meningen nachgewiesen werden (Messlinger et al. 1995).

Doch αCGRP positive Nervenfasern kommen auch entlang der trabekulären Struktur von langen Röhrenknochen im Bereich der Metaphyse und Epiphyse vor. αCGRP positive Nervenfasern, die aus dem Periost, den Sehnen oder deren Insertionsstellen im Knochen stammen, können in die Oberfläche des Gelenkknorpels und in die Menisci einwachsen und kommen dabei in engen Kontakt mit Chondrozyten (Schwab et al. 1997).

Gelenkschondrozyten antworten nach Stimulation mit αCGRP mit einer erhöhten Produktion von cAMP (Edoff und Hildebrand 2003). Erhöhte Level von cAMP sollen eine terminale Differenzierung von Chondrozyten inhibieren und so die terminale Differenzierung von Chondrozyten verzögern (Jikko et al. 1996) (Abb. 8).

Muschter *et al.* konnten zudem erstmals eine autonome Produktion von SP und αCGRP muriner Chondrozyten und Knochenzellen zeigen (Muschter et al. 2020). Des weiteren konnte CRLR mRNA und Protein in Osteoblasten der Calvariae von Mäusen und Ratten und Osteoklasten sowie bone marrow derived MSC (BMSC) nachgewiesen werden (Wang et al. 2009).

Dass αCGRP die Proliferation der hMSC, während der osteogenen Differenzierung, beeinflusst, zeigte eine Studie von Xu *et al.*. Mittels Proliferationsassays und dem Nachweis einer erhöhten Zellanzahl in der DNA-Synthesephase des Zellzykluses, S-Phase, und einer Verschiebung des Zellzykluses zugunsten der Mitosephase stütze ihre Vermutung (Xu und Jiang 2014).

αCGRP scheint zudem eine Rolle in der physiologischen Aufrechterhaltung der Knochenstruktur inne zu haben. Schinke *et al.* konnten an CGRP-defizienten Mäusen zeigen, dass sie eine reduzierte Knochenformationsrate aufwiesen und eine Osteopenie entwickelten (Schinke et al. 2004).

Welche Auswirkungen eine Stimulation von undifferenzierten hMSC mit αCGRP während dem Prozess der chondrogenen Differenzierung hat, ist noch unbekannt.

1.5.2 Der sensible Neurotransmitter Substanz P

Substanz P (SP) ist ein Neuropeptid, das der Tachykinin Familie angehört. Tachykinine erhielten ihre Bezeichnung aufgrund der Eigenschaft, eine Tachykardie bei niedrigem Blutdruck hervorzurufen (McGillis *et al.*, 1990).

Bis dato wurden 5 Tachykinin Subtypen gefunden: Substanz P, Neurokinin A, Neurokinin B, Neuropeptid K und Neuropeptid C. Substanz P ist ein aus 11 Aminosäuren bestehendes Peptid.

Es gibt zwei für die Tachykininsynthese verantwortliche Gene: Preprotachykinin I-Gen (PPT-I bzw. PPT-A, Tac1) und Preprotachykinin II-Gen (PPT-II bzw. PPT-B). Durch alternatives Splicing entstehen vier verschiedene mRNA Sequenzen aus dem PPT-I Gen. Davon kodieren α-mRNA und δ-mRNA ausschließlich für SP.

Das Neuropeptid SP wird in den Zellkörpern der Spinalganglien oder anderer Ganglien wie zum Beispiel des Trigeminusganglions synthetisiert und gelangt über den axonalen Transport zu den peripheren Nervenendigungen und den präsynaptischen Enden des Rückenmarks. Im zentralen und peripheren Nervensystem fungiert SP als Neuromodulator, Neurotransmitter und trophischer Faktor (Otsuka und Yoshioka 1993). Seine Wirkung entfaltet es durch Bindung an einen Neurokininrezeptor (NK-Rezeptor, NKR). Es wurden 3 zugehörige Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität zu den einzelnen Liganden identifiziert: NKR1, NKR2 und NKR3 (Goto und Tanaka 2002). SP hat hierbei die höchste Affinität zum NKR1.

Dieser besteht aus sieben hydrophoben, transmembranösen Bestandteilen und ist durch extra- und intrazelluläre schlingenförmige Proteinketten verbunden, welche, wie die Rezeptoren des CGRPs, der Gruppe der G-Protein gekoppelte Rezeptoren angehört (Gerard et al. 1993), (Abb. 9).

Wie bereits anhand des CGRP-Rezeptors dargestellt, können auch beim NK1-Rezeptor je nach aktivierter Untereinheit ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha 12/13}$, $G_{\alpha 0}$, $G_{\alpha q}$) verschiedene nachgeschaltete Signalwege aktiviert werden (Garcia-Recio und Gascón 2015).

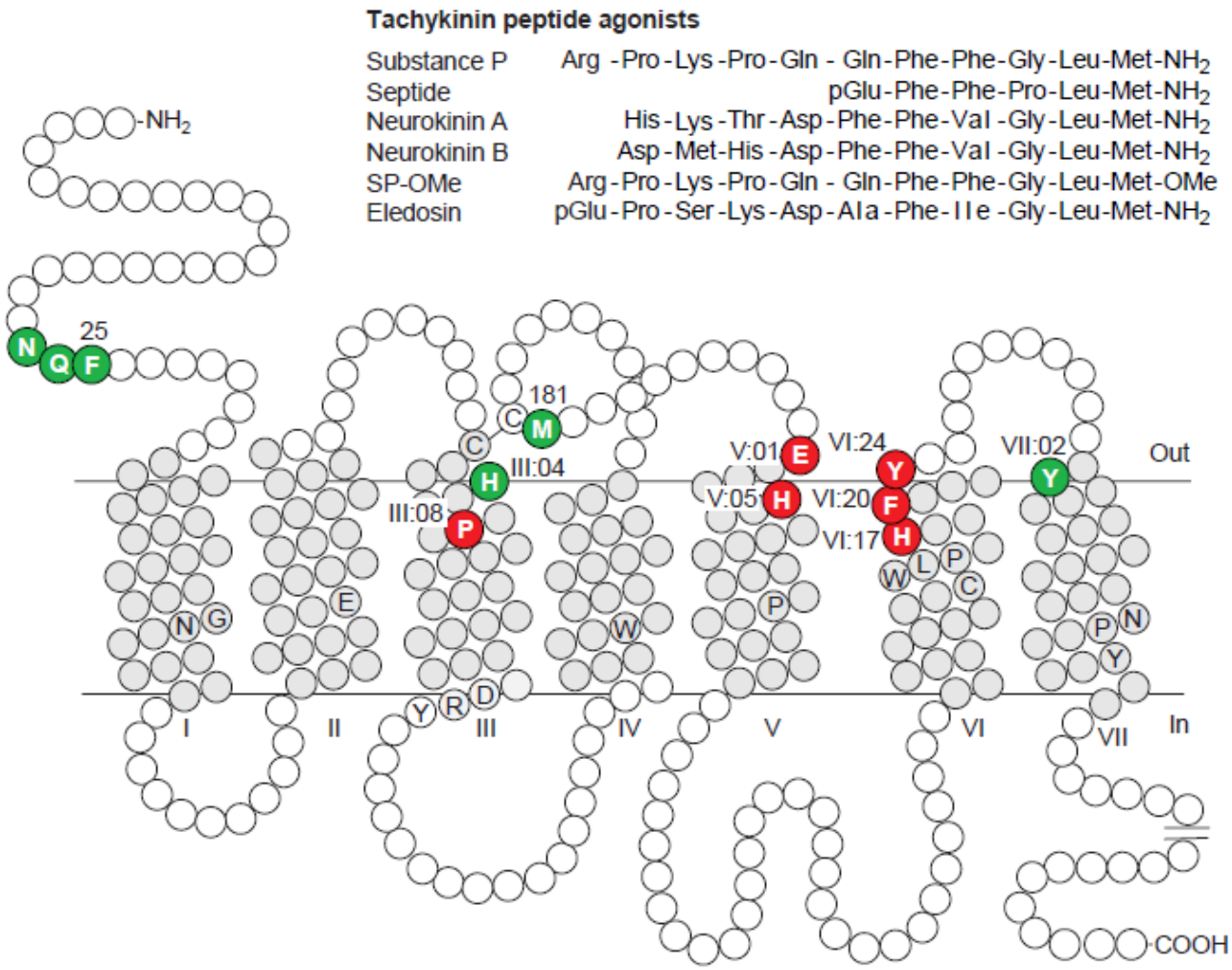


Abb. 9 :Schematische Darstellung eines Tachykininrezeptors und die Aminosäuresequenz seiner verschiedenen Liganden (Maggi und Schwartz 1997).

Doch SP fungiert nicht nur als klassisches Neuropeptid der Nozizeption, dem Neuropeptid werden auch spezielle Funktionen in unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Prozessen wie der Vasodilatation, Plasmaextravasation, im gastrointestinalen System (Wu et al. 2008), Schmerzübertragung (Li et al. 2012), neurogenen Inflammation (Leonard et al. 2014), Angiogenese und im muskuloskelettalen System (Offley et al. 2005) zugeschrieben.

So konnten SP positive Nervenfasern im Periost, der Wachstumsfuge, im Knochenmark und subchondralen Knochen nachgewiesen werden (Liu et al. 2007, Goto und Tanaka 2002, Richardson et al. 2009).

Des weiteren konnte eine autonome Produktion von SP bzw. seines Rezeptors NK1 in mehreren Zellgruppen des muskuloskelettalen Systems, darunter Chondrozyten Osteoblasten, Osteoklasten und hMSC nachgewiesen werden (Wang et al. 2009; Niedermair et al. 2018; Lerner und Persson 2008; Niedermair et al. 2014).

Knorpelkanäle sind röhrenartige Gebilde, die unter anderem in der Epiphyse junger Ratten nachgewiesen werden konnten. Sie enthalten Blutgefäße und tragen zur Entstehung des sekundären Ossifikationszentrums im Bereich der Epiphyse bei (Blumer et al. 2005).

Die Autoren Oliva *et al.* konnten zeigen, dass in diesen Knorpelkanälen SP positive Nerven wachsen. Sie durchbrachen die Kanäle des wachsenden Knorpels in der Epiphyse von jungen Ratten, wobei sie hier in engem Kontakt mit den Chondrozyten kamen (Oliva et al. 2005). Die Autoren schlossen daraus, dass das sekundäre Ossifikationszentrum folglich nur in Anwesenheit des sensiblen Nervensystems gebildet wurde. Diese Beobachtung implizierte eine wichtige Funktion der Neuropeptide in der chondrogenen Differenzierung während des Skelettwachstums in der Embryonalphase. Opolka et *al.* konnten zudem nachweisen, dass Chondrozyten in vitro nach Stimulation mit SP signifikant die Genexpression der Kollagene Typ I, IX, X und MMP 13 steigerte, was die Rolle in der chondrogenen Differenzierung weiter stützt und vor allem auf eine Förderung der terminalen Differenzierung der Chondrozyten hinweist (Opolka et al. 2012). SP beeinflusste auch konzentrationsabhängig die Proliferationsaktivität der Chondrozyten. Korrelierend dazu ließ sich nach Behandlung der Zellen mit einem NK1-Antagonisten L733060 eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit der Chondrozyten feststellen. Nach SP-Stimulation von neugeborenen murinen Chondrozyten ließ sich zudem eine vermehrte Ausbildung von fokalen Kontakten nachweisen (Opolka et al. 2012).

hMSC wiesen ebenfalls nach Stimulation mit SP eine verbesserte Proliferationsaktivität und erhöhtes Migrationspotential auf (Dubon und Park 2015) (Abb. 10).

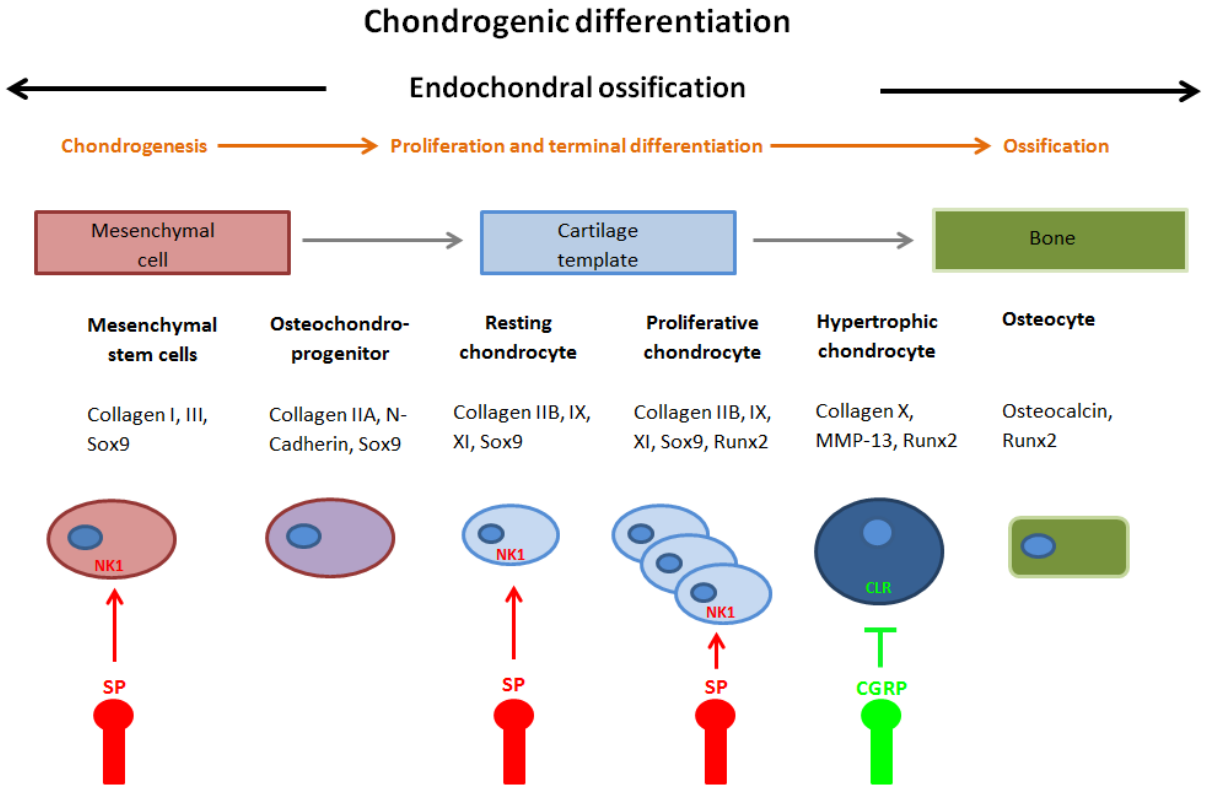


Abb. 10: Schematische Darstellung der Effekte von SP und αCGRP auf die chondrogene Differenzierung. Modifizierte Abbildung nach Grässel 2014. SP wirkt hierbei über den NK1 Rezeptor stimulierend (Pfeil) auf die chondrogene Differenzierung, während αCGRP über seinen zugehörigen Rezeptor inhibierend (Balken) auf die terminale Differenzierung der hypertrophen Chondrozyten wirkt. Modifizierte Abbildung aus (Grassel 2014).

Vor allem SP und sein zugehöriger Rezeptor scheinen als Mechanosensoren eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung physiologischer Prozesse, die die Homöostase verschiedener Gewebe beeinflusst, zu spielen.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass murine Chondrozyten und menschliche Gelenkchondrozyten SP und seinen Rezeptor NK1 nach mechanischer Stimulation produzieren. Millward und Sadler konnten mittels Immunhistochemie nachweisen, dass Chondrozyten pre-protachykinin mRNA, SP und den dazugehörigen NK1-Rezeptor *in vivo* and *in vitro* exprimieren. Die Stimulation der Chondrozyten mit 1 µmol/l SP, als auch die mechanische Stimulation mit 0,33 Hz bewirkte eine Hyperpolarisation der Chondrozytenzellmembran, was einen Hinweis auf eine mögliche Rolle von SP in der Mechanotransduktion der Chondrozyten gibt. Korrespondierend zu diesen Beobachtungen führte eine Blockade des NK1-Rezeptors zu einer inhibierten Antwort der Chondrozyten auf mechanische Reize (Millward• Sadler et al. 2000). In Mäusen, denen das SP codierende Gen, Tachykinin 1, fehlt, wurde ein negativer Einfluss auf die Prozesse der Frakturheilung nachgewiesen. Aber auch die biomechanische Qualität des Knochens der nicht frakturierten Kontrollgruppe von Wildtyp Mäusen zeigte sich beeinträchtigt (Niedermair et al. 2014).

Woraufhin die Autoren schlussfolgerten, dass durch Stimulation mit SP die mechanische Transduktion über den NK1-Rezeptor in einem autokrinen oder parakrinen Mechanismus beeinflusst wird und so eine Rolle in der Aufrechterhaltung und Regulierung der Knorpelmatrixintegrität innehaben könnte (Millward Sadler et al. 2000).

SP scheint auch über die Induktion kataboler Signalwege eine proinflammatorische Wirkung zu begünstigen.

Nach SP-Stimulation von Synovialzellen konnte eine vermehrte Produktion von IL1β, MMPs und TNFα nachgewiesen werden. Des weiteren ließ sich SP vermehrt in der Synovialflüssigkeit und im Synovialgewebe von Patienten, die an Arthrose leiden, nachweisen (Inoue et al. 2001). In Kombination mit basic fibroblast growth factor 2 *(*FGF2) beschleunigte SP über den NK1 Rezeptor die Matrix Degradation durch Stimulation von Knorpelabbauenden Enzymen, wie MMP13, in menschlichen Gelenkchondrozyten und reduzierte nachweislich die Bildung von Proteoglykanen, was eine katabole Wirkung von SP wahrscheinlich macht (Im et al. 2008).

Welche Auswirkungen eine Stimulation mit SP auf undifferenzierte hMSC und während dem Prozess der chondrogenen Differenzierung hat, ist noch unbekannt.

2 Ziel der Arbeit

Hyaliner Gelenkknorpel ermöglicht durch seine glatte Oberfläche, welche die Reibung minimiert, ein effizientes Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen und durch seine Druckelastizität das Tragen schwerer Lasten ohne strukturellen Verlust.
Im Gegensatz zu anderen muskuloskelettalen Geweben stellt der hyaline Gelenkknorpel ein alymphatisches, gefäßfreies und aneuronales Gewebe dar, was seine geringe Regenerationsfähigkeit erklärt.
Chondrale Läsionen daher suffizient zu behandeln, stellt die aktuelle Medizin vor große Herausforderungen.
Eine Vielzahl von Regulationsmechanismen sind an der Entstehung und der Homöostase des Knorpelgewebes beteiligt. Diese werden unter anderem vom sensiblen Nervensystem beeinflusst.
SP und αCGRP fungieren nicht nur als klassische Neuropeptide der Nozizeption, sondern sie scheinen auch autokrine und parakrine Funktionen zu besitzen und als trophische Faktoren den Metabolismus von Chondrozyten und die Beschaffenheit der Knorpel-EZM zu beeinflussen.
Die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen zur Behandlung chondraler Läsionen stellt einen besonders attraktiven Ansatz im Bereich der regenerativen Medizin und des Tissue- Engineering dar.
In dieser hier vorliegenden Arbeit sollen daher die Effekte der sensiblen Neurotransmitter SP und αCGRP auf die chondrogene Differenzierung und Zellvitalitat von mesenchymalen Stammzellen genauer untersucht werden. Dabei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

»Welchen Einfluss haben SP und α-CGRP auf die chondrogene Differenzierung von hMSC?

»Wie wird das Zellzyklusgeschehen, die Proliferation und Apoptose der hMSC nach Neurotransmitterstimulation mit SP und α-CGRP beeinflusst?

»Inwiefern modulieren unterschiedliche Konzentrationen der Neurotransmitter die chondrogene Differenzierung und den Metabolismus von hMSC?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultursystem

3.1.1 Aussaat und Passagieren der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen hMSC wurden in Passage 2 aufgetaut. Jeweils 1 Mio. Zellen wurden in eine T-175 cm^2-Flaschen ausgesät, in 25 ml StemMACS hMSC Expansion Medium (DMEM, L-Glutamine, Fetales Bovines Serum, 1ml MycoZap, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und unter Standardbedingungen (wasserdampfgesättigt, 37°C, 5% CO2) kultiviert. Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei Erreichen einer 75- bis 85 %igen Konfluenz wurden die Zellen jeweils passagiert und bis höchstens Passage 4 kultiviert. Anschließend wurde mit diesen Zellen SP- bzw. αCGRP-Stimulationsversuche im 2D und 3D-Zellkultursystem durchgeführt.

3.1.1.1 Chondrogene Differenzierung – 3D-Zellkultur

Zur Untersuchung der chondrogenen Differenzierung wurde eine Fibringel-gestützte Pelletkultur verwendet (Haleem et al. 2010). Nachdem die hMSC in Passage 4 eine 75- bis 85%-ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit Hilfe von Accutase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) abgelöst und je 2 Millionen Zellen in ein Eppendorfcup überführt. Diese wurden mit einem Gemisch von 10 µl Fibrinogen und 18 µl Thrombin zu einem Pellet geformt und in eine 24-Well-Platte pipettiert. Nachdem die Gele für 45 Minuten (min) im Brutschrank polymerisierten, wurde pro Well 0,5 ml chondrogenes Differenzierungsmedium auf die Fibringele gegeben (Medium-Bestandteile: DMEM high Glucose (Nr.: 11971-025, Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), 0,1µM Penicillin/Streptomycin (Sigma - Aldrich, St.Louis, USA), Dexamethason 0,1 µM (Sigma, Saint Louis, USA), 40µg/ml Prolin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 110 µg/ml Pyruvat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), ITS (6,25µg/ml Insulin, 6,25 ng/ml Selensäure, 6,25µg/ml Transferrin, 1,25 mg/ml BSA und 5,35 µg/ml Linolsäure), (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), 50µg/ml Ascorbat-2-Phosphat (A_2P) (Sigma, Saint Louis, MO, USA) und 10 ng/ml TGF-β3 (PEPROTECH, Rocky Hill, USA)). Es erfolgte ein täglicher Mediumwechsel, wobei TGF-ß3 und A_2P immer frisch zugegeben wurden. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen mit den Neuropeptiden SP oder αCGRP stimuliert (Abb. 9). Die Gele wurden an vier verschiedenen Zeitpunkten geerntet, an Tagen 7, 14, 21 und 28. Dabei wurde zum einen der Zellkultur-Überstand abgenommen und bei -20°C aufbewahrt, um einen IL1ß-ELISA durchführen zu können. Jeweils ein Gel wurde für die RNA-Isolation geerntet (siehe 3.1.2.1) und die übrigen Gele wurden halbiert und eine Hälfte für eine Alcianblau-Färbung fixiert (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (siehe 3.1.4), und die andere Hälfte für eine

quantitative Glykosaminoglykan-Analyse und Kollagen II ELISA (siehe 3.1.3) bei -80°C eingefroren (Abb. 11).

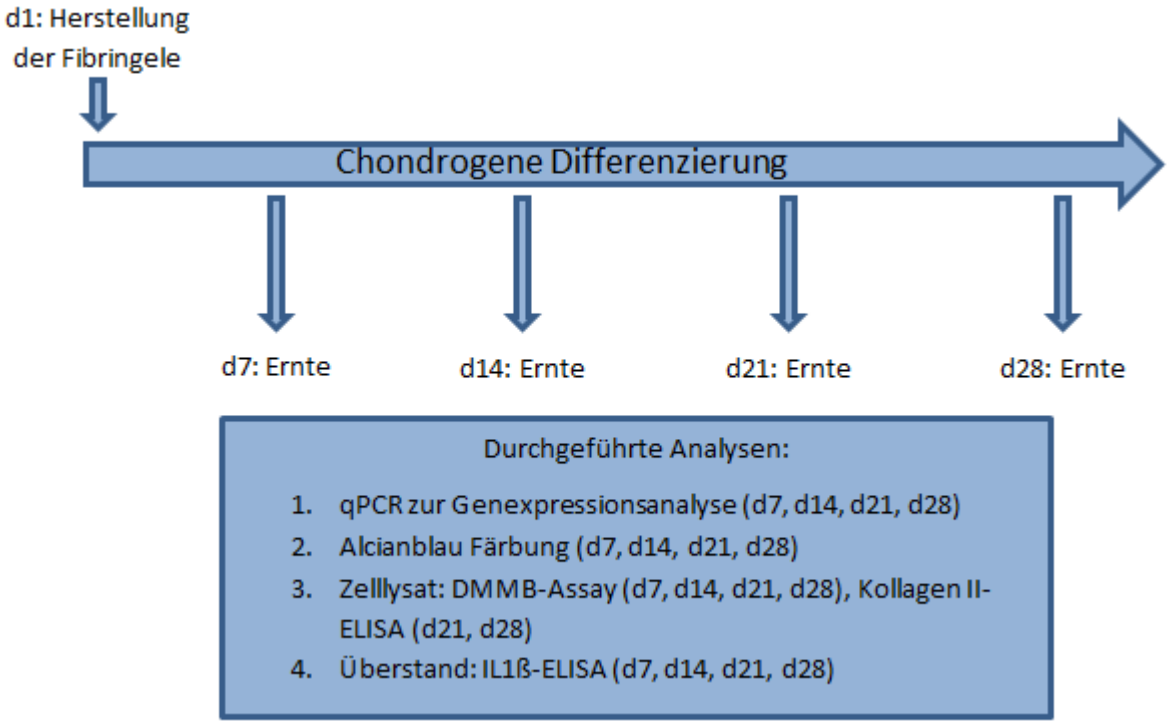


Abb.11: Zeitplan für chondrogene Differenzierung mit einzelnen Erntezeitpunkten und ausgewählten Analysen.

3.1.1.2 Monolayer-Kultur – 2D-Zellkultur

Zeitgleich mit der Aussaat der Zellen für den Chondrogenese-Versuch, wurden hMSC auch für Monolayer-Versuche ausgesät und in Proliferationsmedium (Medium-Bestandteile: DMEM low Glucose (Nr. 11885084, Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), 0,1µM Penicillin/Streptomycin (Sigma - Aldrich, St.Louis, USA), 10 % FCS (*fetal calf serum)* (Nr. 10500064, Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)) kultiviert, um den Einfluss der Neurotransmitter SP und αCGRP auf undifferenzierte hMSC zu untersuchen. Zellzyklusanalysen wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (siehe 3.4), die Proteinexpression von Cyclin D1, Sox9 und Phospho-Sox9 wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (siehe 3.3.4) und die Genexpression von verschiedenen Markergenen wurden mittels qPCR untersucht (siehe 3.2.3) (Abb. 12).

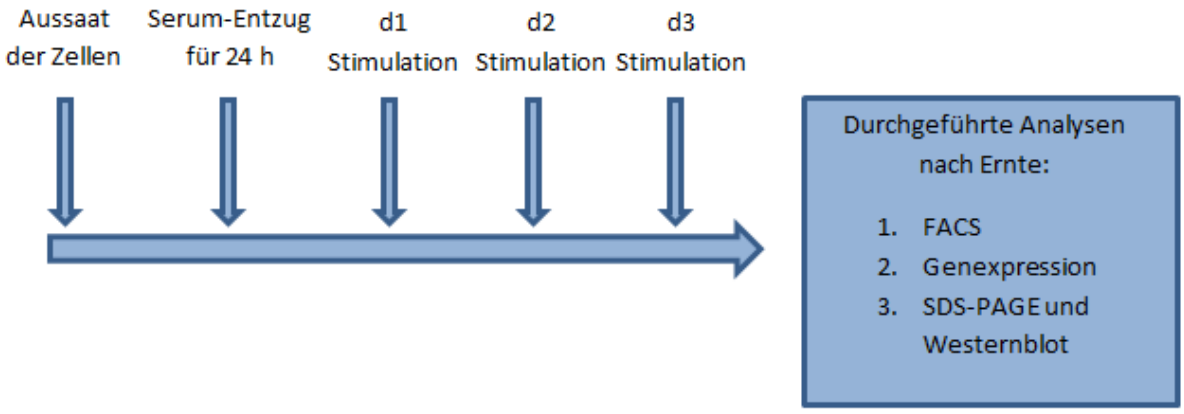
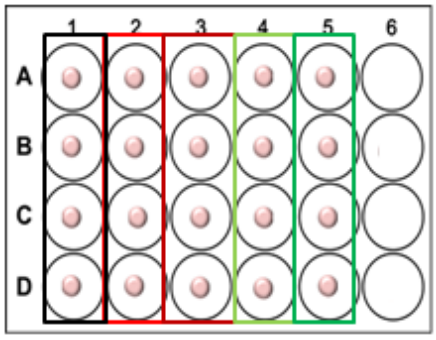


Abb. 12: Schematische Darstellung für den Ablauf der Monolayer-Kultur-Versuchsreihe. Am ersten Tag der Versuchsreihe wurden die Zellen ausgesät, am 2. Tag wurde 24h lang FCS entzogen. Nach zweitägiger Stimulation mit SP und αCGRP wurden die Zellen geerntet und entweder eine durchflusszytometrische Untersuchung, eine SDS-PAGE und anschließende Western Blot Analyse ausgewählter Proteine oder eine Genexpressionsanalyse durchgeführt.

3.1.2 Die Stimulation mit Neurotransmittern

Um den Einfluss der Neurotransmitterstimulation auf die hMSC zu untersuchen, wurden die Neurotransmitter SP (Nr.:S6883, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und αCGRP ((human) H-1470, Bachem, Bubendorf, Schweiz) in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet. Dabei orientierten wir uns an den Ergebnissen von Niedermair *et al.*, die dokumentierten, dass Osteoblasten und Osteoklasten SP in pM-Bereich (10^{-12}) produzieren können (Niedermair et al. 2018).

Für einen Versuchsdurchlauf wurden sowohl im 2D- wie auch im 3D-Zellkultur-System fünf Gruppen gebildet: Eine für die unstimulierte Kontrolle, bei der nur der tägliche Mediumwechsel ohne Zugabe der Neuropeptide durchgeführt wurde und je zwei Gruppen für einen Neurotransmitter. Sowohl SP als auch αCGRP wurden in einer Konzentration von 10^{-8} M und 10^{-10} M verwendet (Abb. 13).



Tägliche Stimulation in chondrogenem Medium mit:

1. Kontrollmedium (unstimuliert)
2. 10^{-8} M SP
3. 10^{-10} M SP
4. 10^{-8} M αCGRP
5. 10^{-10} M αCGRP
6. Blank

Abb. 13: Mögliche Plattenbelegung und Stimulationsschema einer 24-Well-Platte mit Fibringelen.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 RNA-Isolierung aus hMSC

Die RNA-Isolation aus den Fibringelen erfolgte mithilfe des MasterPure Complete RNA Purification Kit von Epicentre, vertrieben durch Biozym.

Zuerst wurde das Fibringel in Lösung gebracht. Dies erfolgte mit einer Tissue and Cell Lysis Solution und 50µg/µl Proteinase K bei 65°C. Für die Protein-Präzipitation wurde MPC Protein Precipitation Reagent zum Lysat gegeben und für die Fällung der gesamten Nukleinsäuren wurde 1ml Isopropanol zum Überstand zugegeben. Ein Verdau der enthaltenen DNA erfolgte mit RNAse-Free DNase I bei 37°C für 10 bis maximal 20 min. Nach Zugabe von 2x Lysepuffer, MPC Protein Precipitation Reagent und anschließender (13000xg, 4°C, 10 min) konnte der Überstand erneut abgenommen und in ein neues Eppendorf-Cup gegeben werden und mit Isopropanol versetzt werden. Das entstandene Pellet wurde anschließend zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bevor 35 µl des TE-Puffers (TRIS- und EDTA-Puffer) hinzugegeben wurden und die RNA vollständig darin resuspendiert wurde.

Für die RNA-Isolierung aus Monolayer-Proben wurde das Absolutely RNA Miniprep Kit von Agilent Technologies nach den Angaben des Herstellers verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Menge des Lysis-Puffers und das Volumen des zugegeben ß-Mercaptoethanols richtete sich nach der Anzahl der isolierten Zellen (zwischen 3.5x bis $5x10^5$ Zellen): Bei $1x10^4$ bis $1x10^5$ Zellen wurden 100µl Lysis Puffer und 0,7 µl ß-Mercaptoethanol zugegeben, bei $1x10^5$ bis $1x\ 10^6$ Zellen wurden 200 µl Lysis-Puffer und 1,4 µl ß-Mercaptoethanol verwendet. Nach mehrfachem Vortexen wurde das Gemisch in ein Prefilter Spin Cup überführt und bei 13400 xg für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend mit dem gleichen Volumen an 70 % Ethanol versetzt, was zuvor auch an Lysis Puffer zugegeben wurde und in ein neues RNA Binding Spin Cup überführt. Nach dem Zentrifugieren, wurden dem Zentrifugat 600 µl vom Low-Salt Wash Buffer zugegeben und erneut zentrifugiert. Für den Verdau mit DNAse wird eine DNAse Lösung aus 195µl DNAse Digestion Buffer und 5µl RNAse-free DNAse I hergestellt und nach Zugabe zum Spin Cup für 15 min im 37°C Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden nochmals verschiedene Waschschritte mit High-Salt Wash Buffer und Low-Salt Wash Buffer durchgeführt. Der letzte Schritt ist die Elution der RNA aus dem Filter des Binding Cups. Dies wird mit 20µl des Elution Buffers vorgenommen. Anschließend kann die RNA-Menge mit dem NanoDrop 2000 Fotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachutes, USA) gemessen werden.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung und cDNA-Synthese

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die gelöste RNA mit dem NanoDrop 2000 Fotometer gemessen (Thermo Fisher Scientific, Massachutes, USA). Hier wurde mithilfe einer spektrophotometrischen Untersuchung nicht nur die Konzentration der RNA bestimmt,

es wurde auch die Reinheit der RNA im Vergleich zur enthaltenen DNA berechnet und als 280/260nm Quotient ausgegeben. Auch der 260/230nm Quotient wurde berechnet. Er lieferte eine genauere Aussage über eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen.
Um einzelsträngige cDNA aus isolierter RNA herzustellen, wurde der „AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit“ (Stradene, Agilent Technologies, La Jolla, USA) laut Herstelleranleitung durchgeführt.
Es wurden 10µl cDNA synthesis master mix (2-fach konzentriert), 1,5µl oligo(dT)-Primer, 1,5µl Random Primer, 1µl Affinitiy Script RT/RNase Block enzyme mixture in einem Well gemixt. Entsprechend dem Gehalt an RNA (0,3pg-3µg RNA) in einer Probe wurde eine bestimmte µl-Anzahl hinzugegeben. Mit RNase-freiem Wasser wird auf das Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die cDNA Synthese wurde mittels PCR mit folgendem Schema durchgeführt: 5 min: 25°C, 15 min: 42°C und 5 min: 95°C. Die umgeschriebene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Für die qPCR Analysen wurde der Brilliant II SYBR-Green Kit von Agilent (Stradene, Agilent Technologies, La Jolla, USA) benützt. Mit jedem Versuchsansatz wird ein sogenanntes „Housekeeping“ Gen als Ladekontrolle der zu untersuchenden Proben mitgeführt. Als Referenz für die Fluoreszenz-Messung wird ROX (5-Carboxy-Rhodamin-X) zu jeder Probe zugegeben. Wird die Expression mehrerer Gene gemessen, wird ein Mastermix bestehend aus molekularem Wasser, SYBR-Green und den entsprechenden Forward und Reverse Primern hergestellt. Der Mastermix für ein Well setzt sich, wie unten in der Tabelle 1 aufgeführt, zusammen. Es wurde eine Doppelbestimmung der Proben durchgeführt. Das hinzugefügte SYBR-Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff der an doppelsträngige DNA bindet und als DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex blaues Licht bei einer Wellenlänge λmax = 494 nm absorbierte und grünes Licht bei λmax = 521 nm emittiert, und von der Agilent MxPro qPCR Software für Mx3000P und Mx3005P QPCR Systeme (Stradene, La Jolla, USA) analysiert wird.
Folgendes qPCR Programm wurde benützt:

1. Schritt: Denaturierung der Probe für 15 min bei 95°C
2. Schritt: Vervielfachen des Produkts mit 40 Zyklen von abwechselnd 10 sec bei 95°C und 30 sec bei 60 °C (Annealing und Elongation)
3. Schritt: Generierung der Schmelzkurven mit 1 min bei 95 °C, 30 sec bei 55°C und weiteren 30 sec bei 95 °C

Im Monolayer Versuch wurden folgende Gene untersucht: COL1A1, COL2A1, COL9A1, VEGFα, SOX9, ITGA10, ITGA11, IL1ß, IL8, TNFα und FGF2.

Tabelle 1: PCR-Ansatz für ein Well

Bestandteile	Menge in µl
SYBR-Green	12,5 µl
Forward-Primer	0,5 µl
Reverse-Primer	0,5 µl
diluted Rox	0,375 µl
H_2O	6,125 µl
cDNA	5 µl

Die qPCR wurde sowohl zur Genexpressionsuntersuchung für die Monolayer-Kulturen (2D) als auch für die Fibringel Versuche (3D) durchgeführt.

Spezifische Primer für die Gensequenzen wurden mit der Software Primer3 (sourceforge.net®) und der Genomdatenbank Ensembl (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, UK, www.ensembl.org/index.html) generiert. Die Primer wurden von den Firmen Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, D) und Microsynth AG (Balgach, CH) produziert (Tab. 2).

Tabelle 2: Primerliste:

Genname	Sequenz 5 → 3	Tm °C	Ampli-con	NIH accessionnumber
BCL2	fwd: ATG TGT GTG GAG AGC GTC AA	57	136	NM_000633.2
	rev: ACA GTT CCA CAA AGG CAT CC			
BMP6	fwd: GCG ACA CCA CAA AGA GTT CA	57.3	203	NM_001718.4
	rev: CCC ATA CTA CAC GGG TGT CC	61.4		
COL1A1	fwd:ACG TCC TGG TGA AGT TGG TC	59.4	172	NM_000088
	rev:ACC AGG GAA GCC TCT CTC TC	61.4		
COL10A1	fwd: CCC TCT TGT TAG TGC CAA CC	59.4	154	X72580
	rev:AGA TTC CAG TCC TTG GGT CA	57.3		
COL2A1	fwd: CCA GAT GAC CTT CCT ACG CC	62,5	186	NM_001844.4 / NM_033150.2
	rev: TTC AGG GCA GTG TAC GTG AAC	61,2		
COL3A1	fwd: CTT CTC TCC AGC CGA GCT TC	60,1	187	NM_000090.3
	rev: TGT GTT TCG TGC AAC CAT CC	59,3		
COL9A1	fwd: GAG CAC CGA CAG ATC AGC AC	62,5	104	NM_001851.4 / NM_078485.3
	rev:AGT GGC ACC TGA GTC TGG A	59,5		
FGF2	fwd: CCG TTA CCT GGC TAT GAA GG	59.4	193	NM_002006
	rev:TTT CTG CCC AGG TCC TGT T	56.7		
GAPDH	fwd: CTG ACT TCA ACA GCG ACA CC	59.4	120	J04038
	rev:CCC TGT TGC TGT AGC CAA AT	57.3		
IL1 beta	fwd: CCC TAG GGA TTG AGT CCA CA	59.4	101	NM_000576.2
	TCA GCA CCT CTC AAG CAG AA	57.3		
IL-6	fwd: CAA TGA GGA GAC TTG CCT GG	59.4	113	NM_000600
	rev:GCA CAG CTC TGG CTT GTT CC	61.4		

IL-8	fwd: TGA CTT CCA AGC TGG CCG TG	63,0	184	NM_001354840.3
	rev:GCGC AGT GTG GTC CAC TCT CA	64,9		
ITGA10	fwd: GTG TGG ATG CTT CAT TCC AG	56,8	92	NM_003637.5
	rev: GCC ATC CAA GAC AAT GAC AA	56,3		
ITGA11	fwd:: GCA GCA GCC TGA GCC ACT AC	63.5	281	NM_001004439.2
	rev: AGC ACG ACG CAA GTC TTC CTC	62.93		
SOX9	fwd: GTA CCC GCA CTT GCA CAA C	62.1	74	NM_000346.3
	rev: TCT CGC TCT CGT TCA GAA GTC	60.3		
TNFα	fwd: TCC TTC AGA CAC CCT CAA CC	58,94	122	NM_000594.4
	rev: CAC ATT CCT GAA TCC CAG GT	57,19		
VEGFα	fwd: CTT GCC TTG CTG CTC TAC	55,8	88	NM_001025366.1
	rev: ACC ACT TCG TGA TGA TTC TG	55.5		

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Glykosaminoglykangehalt-Bestimmung in Fibringelen

3.3.1.1 DMMB-Assay

Die Hälfte eines Fibringels wurde für den Dimethylmethylene Blue Assay (DMMB-Assay) eingesetzt. Mit dem DMMB-Assay wird der GAG-Gehalt ermittelt. GAG sind sulfatierte Moleküle, die ein wichtiger Bestandteil der EZM sind und im Laufe der Chondrogenese gebildet werden. Vor dem Verdau wurden zuerst alle Proben eines Chondrogenese Versuchs (hMSC in Fibringelen) gesammelt und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurden alle Proben mit 62,5 µl eines NaCl/Essigsäure-Puffers versetzt und anschließend wurde ein Gemisch aus Essigsäure und Pepsin hinzugegeben. Daraufhin erfolgte ein 24h-Verdau auf einem Drehrad (25xg) bei 4°C. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert (1min, 10.000xg), um sie dann mit dem PowerGen Tissue Homogenizer (Thermo Fisher Scientific, Massachusates, USA) zu zerkleinern. Den Proben wurde nochmals NaCl/Essigsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Essigsäure/Pepsin zugefügt, um sie dann für 48 h auf dem Drehrad bei 4°C zu inkubieren. Für das weitere Prozedere wurde den Proben 10x TBS (Merck, Darmstadt, Deutschland) beigemischt und dann der pH-Wert mit 1M NaOH auf 8 eingestellt, bevor 1 mg/ml Elastase (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben wurde. Nach weiteren 24h auf dem Drehrad bei 4°C wurden alle Proben zentrifugiert, (5min, 10.000xg), der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Cup überführt.

Zuerst wurde für den DMMB-Assay eine Standard-Konzentrationsreihe mit Chondroitinsulfat und 0,5 M Na_2EDTA mit 0,00726g/10ml L-Cystein angesetzt. Die Proben wurden unverdünnt und in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte gegeben und anschließend 250 µl DMMB-Assay (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) Reagenz zu jedem einzelnem Well

beigefügt. Die Messung erfolgte im Tecan GENios Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 590-595 nm.

3.3.1.2 Picogreen-Assay

Der Picogreen Assay (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit) wurde im Anschluss an den DMMB-Assay durchgeführt, somit konnte der GAG-Gehalt im Verhältnis zur DNA-Menge im Zelllysat dargestellt werden. Für die Durchführung des Versuchs wurden sowohl der Standard, die Proben und auch das Picogreen Reagenz verdünnt (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Dazu wurde zunächst der 20x TE Puffer (TRIS- und EDTA-Puffer) auf eine 1-fache Konzentration verdünnt und anschließend eine Verdünnungsreihe der Standards hergestellt. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:5 und das Picogreen-Reagenz in einem Verhältnis von 1:200 eingesetzt. Alle Proben wurden in eine schwarze 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden pipettiert und 100 µl vom Picogreen-Reagenz in jedes Well zugegeben. Die photometrische Bestimmung erfolgte nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln im Tecan GENios Microplate Reader bei 540 nm Wellenlänge.

3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden jeweils hMSC aus fünf T-75 cm^2 Flaschen (Monolayer) geerntet (entspricht in etwa 350.000 bis 500.000 Zellen pro Flasche) und lysiert. Hierfür wurde den Zellen je nach Zellzahl ein gewisses Volumen an RIPA-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), mit einem Protease- (Complete Mini, Roche, Penzberg, Deutschland) und/oder Phosphataseinhibitor (PhosphoSTOP, Roche, Penzberg, Deutschland) zugegeben. Bei 500.000 Zellen wurden 75 µl RIPA-Puffer, 7,5 µl PhosphoSTOP (10x) und ca. 11 µl Complete Mini (7x) hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis, in der die Proben alle fünf Minuten für 20 Sekunden gevortext wurden. Es folgte eine Ultraschallbehandlung (3 Zyklen, 10 sec). Daraufhin wurden die Proben für 20 min (4000xg, 4°C) zentrifugiert und der Überstand entnommen und in ein neues Eppendorf-Cup überführt.

3.3.3 BCA-Assay

Der Pierce BCA™ProteinAssay Kit (Bicinchoninic acid assay) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde entsprechend der mitgelieferten Anleitung durchgeführt. Zuerst wurde für den Assay eine Verdünnungsreihe mit 6 verschiedenen Konzentrationen (0-2000µg/ml) an BSA angefertigt, um später eine geeignete Referenzkurve berechnen zu können. Des Weiteren wurde das BCA™ Working Reagent, mit den im Kit enthaltenen Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50:1 hergestellt, und jeweils 200 µl der Lösung zu jeder Probe pipettiert. Als Probe dienten jeweils 10 µl des Proteinlysats, die 1:10 verdünnt eingesetzt

wurden. Mit allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem Photometer (TECAN Reader) vermessen.

3.3.4 SDS-PAGE und Western-Blot

Beim Western-Blot wird ein Proteingemisch anhand des Molekulargewichts mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Trägermembran übertragen und eine Proteinbande anhand einer spezifischen Antikörperreaktion detektiert.

Für eine SDS (Natriumdodecylsulfat)-Gelelektrophorese werden die Proben nach Zugabe des 5 x SDS-Ladepuffers für 5-10 min bei 95°C denaturiert. Der Polyacrylamid-Gehalt des Gels wird nach der Expression der zu untersuchenden Proteine ausgewählt und an die Zusammensetzung des SDS-Gels angepasst. Zur Bestimmung des Cyclin D1, Sox9 und Phospho Sox 9 wurde ein 12%iges Gel hergestellt. ß-Actin diente als Ladekontrolle für die spätere Auswertung. Die weitere Durchführung des Versuchs konnte mithilfe des Protokolls der BioRad-Apparatur vorgenommen werden.

Tabelle 3: Zusammensetzung Trenngel und Sammelgel:

Trenngel für 2 Gele	6%	8 %	10 %	12 %	15 %
H_2O	10,6	9,3	7,9	6,6	4,6
30% Acrylamid Mix	4	5,3	6,7	8,0	10,0
Trenngelpuffer (1,5M Tris pH 8,8; 10% SDS)	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
10% Ammonium Persulfat (0,1g/ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
TEMED	0,0016	0,0012	0,008	0,008	0,008
∑	20 ml	20ml	20ml	20ml	20ml

Sammelgel für ein Gel	alle %
H_2O	2,78
30% Acrylamid Mix	0,83
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris pH 6,8, 10%SDS)	1,3
10% Ammonium Persulfat	0,05
TEMED	0,05
∑	5ml

A) Herstellung eines denaturierenden Polyacrylamidgels

Zwei Gelglasplatten werden mit Alkohol gereinigt und die Glasplatten aneinander fixiert. Der entstandene Zwischenraum wird zu ca. 4/5 mit 12%igem Trenngel gefüllt und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach einer Aushärtungszeit von etwa einer halben Stunde wurde das Isopropanol abgegossen und das feste Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Bevor das Sammelgel beginnt auszuhärten, wurde ein Kamm mit 1,5 mm Dicke in das Gel

gesteckt. Nach etwa einer halben Stunde wurden die Gele aus der Halterung entnommen und, eingewickelt in feuchte Tücher, zur Weiterverarbeitung bis zum nächsten Tag in den Kühlschrank gelegt.

B) Vorbereiten der Proben

Anschließend werden die zu untersuchenden Proben vorbereitet: Die Gesamtproteinkonzentration betrug 50 µg Protein pro Bahn. Die Proben wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit Laemmli-Puffer (5x) versetzt und entweder direkt aufs Gel aufgetragen oder bis zum nächsten Tag im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 4: Laemmli-Puffer-Zusammensetzung:

Bestandteile	Volumina
H_2O	2,0ml
1 M TRIS/HCl pH 6,8	3 ml
50 % Glycerin	5 ml
10 % SDS	1g
O,5 M DTT	760 mg
0,01 % Bromophenol blue	10 µl aus 5 % Stocklösung

C) Auftragen der Proben

Die gegossenen Gele wurden in die Elektrophorese-Halterung gespannt und diese mit Runningbuffer (144ml von 192 mM Glycin, 30,3ml von 25 mM TRIS und 10ml von 0,01 % SDS auf 1l H_2O) befüllt. Der Kamm konnte entfernt werden.
Die Proben wurden nun bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend in die Geltaschen gefüllt. Es wurde außerdem 10 µl eines DualColor-Markers (BioRad, Hercules, USA) in eine Tasche gefüllt, um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können.

D) Elektrophorese

Die Laufzeit des Gels betrug bei 120 Volt ca. 2 1/2 Stunden. Anschließend wurde der Runningbuffer abgegossen und das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst.

E) Blotten, Ponceau S-Färbung, Comassie-Färbung und Blockieren

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-membran (0,45 µm) (Bio-Rad, Hercules, USA) übertragen. Dafür wurde das Gel in eine Lösung, bestehend aus 100ml Methanol, 100 ml (10x) Transferbuffer und 800 ml Aqua dest., gelegt und auf eine mit Transferpuffer befeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt. 2 Whatman-Papiere und ein Schwamm wurden jeweils unter die Membran und auf das Gel gelegt. Anschließend wurden

bei 120 mA für 1 Stunde und 45 Minuten die Proteine auf die Nitrocellulosemembran BioRad mit Hilfe des TransBlot Semi dry Systems von BioRad (BioRad, Hercules, USA) geblottet.
Die Nitrocellulosemembran wurde anschließend mit Ponceau S (Firma) für 5 Minuten gefärbt und mit H_20 gewaschen. Dies diente zur Kontrolle der erfolgreichen Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran. Anschließend wurde die Membran in Blockierlösung (5% Milchpulver in PBS-T) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eine Stunde lang inkubiert. Die Gele wurden zur Kontrolle mit Comassie Brilliant Blue gefärbt um die im Gel verbliebenen Proteine sichtbar zu machen. Coomassie - Brilliant Blue R 250 ist ein Triphenylmethan - Farbstoff, der sich an basische Seitenketten von Aminosäuren anlagert und somit Proteine unspezifisch anfärbt (Fazekas de St Groth et al. 1963). Nach 60 min Anfärbung wurden die Gele über Nacht entfärbt und anschließend entwässert und getrocknet.

F) Antikörper Inkubation

Nach dem Blockieren wurde die Membran 3 x 10 min in TBST (Tris-buffered Saline) (Applichem, Maryland Heights, USA) gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primär-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmals 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen. Der HRP (Meerrettichperoxidase)-gekoppelte Sekundär-Antikörper wurde in Blockierlösung (5% Trockenmilch in TBST) verdünnt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einen Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran nochmals 3 x 10 Minuten gewaschen.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Quelle
Maus anti-Cyclin D1 (G124-326)	Cyclin D1	1 : 300	BD Pharmingen
Kaninchen anti-Sox9 (AB5535)	Sox9	1 : 5000	Chemicon
Phospho-Sox9 (AB59252)	Phospho-Sox9	1 : 1000	Abcam
Kaninchen anti ß-Actin (AB8227)	ß-Actin	1 : 5000	Abcam
Goat anti-mouse (sc-2005)	Goat anti-mouse	1 : 5000	Santa Cruz
Donkey anti-rabbit (711-036-152)	Donkey anti-rabbit	1 : 10000	Jackson Immuno Research

G) Chemolumineszenz

Die Detektion der Banden erfolgte in einem ersten Schritt mit Hilfe eines ECL-Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), das dazu diente das HRP Substrat umzusetzen. Um die Banden anschließend sichtbar zu machen, erfolgte die Untersuchung im

Chemilumineszenzgerät Chemi-Smart 5000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Germany) mit der Software Chemi-Capt 5000 Version 12.8 (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany).

H) Stripping

Um die gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen und diese nochmal verwenden zu können, konnte eine Strippinglösung (Re-Blot Plus, Chemicon, Temecula, USA) benutzt werden. Nach 15 Minuten Inkubation mit dem Re-Blot Plus (1:10 Verdünnung in PBS), wurde die Membran 2 x 5 Minuten mit Blockierlösung (5%-iger Trockenmilch) inkubiert. Danach konnte erneut ein spezifischer primärer Antikörper zur Detektion von gebundenen Proteinen eingesetzt werden.

I) Auswertung

Mithilfe des Programms PhotoShop erfolgte die Bearbeitung und Auswertung der Bilder. Zunächst wurde die mittlere Pixelintensität der einzelnen Banden mithilfe eines Histogramms ermittelt, um Rückschlüsse auf die Quantität der Probe zu ziehen. Die gesuchte Proteinbande jeder Probe wurde anschließend auf die ß-Aktin-Bande derselben Probe bezogen, wodurch ein Vergleich mit diesen relativierten Werten möglich wurde. Wurden mehrere Chargen miteinander verglichen, wurde aus den Werten der einzelnen Gruppen (unstimuliert, 10^{-8} M SP, 10^{-10} M SP, 10^{-8} M αCGRP und 10^{-10} M αCGRP) ein Mittelwert gebildet. Die so erhaltenen Mittelwerte für die einzelnen Banden wurden in GraphPad als Boxplot dargestellt, wobei alle unstimulierten Kontrollen auf 1,0 gesetzt wurden. Mittels Mann-Withney-Test wurde abschließend die Expression Sox9, Phospho Sox 9 und Cyclin D1 auf Signifikanz geprüft.

3.3.5 Kollagen II-ELISA

Im Verlauf der Chondrogenese wurde vermehrt Kollagen II gebildet. Zur Quantifizierung des Kollagen II -Gehalts wurde ein Detection Kit der Firma Chondrex, Inc. (Chondrex Inc., Washington, USA) verwendet. Der Kollagen-Gehalt wurde im Zelllysat bestimmt, das für den DMMB-Assay hergestellt wurde (siehe 3.3.1.1). Die Durchführung des Versuchs erfolgte nach dem Protokoll der Firma Chondrex, Inc. Nach dem Sandwich-ELISA-Prinzip wurde die Platte zuerst mit dem Capture-Antikörper versehen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Standards und der Proben. Es wurden ausgewählte Proben analysiert, bei denen sich schon ein Effekt in der GAG-Produktion nachweisen ließ. Nach Zugabe des Detektions-Antikörpers wurde die Platte für 2 Stunden auf den Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender, einstündiger Inkubationszeit mit einem Streptavidin Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörper wurde das zugehörige Substrat o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) hinzugefügt (Abb. 14). Nachdem eine Blaufärbung

in allen Standardproben sichtbar war, wurde die Reaktion mit einer Stopplösung beendet und die Fluoreszenzsignale im Tecan GENios Microplate Reader bei 495nm gemessen. Bei jedem Versuchsaufbau wurden ausgewählte Konzentrationen an Kollagen II mit analysiert. Anhand dieser Konzentrationen konnte anschließend auf die Konzentration der Versuchsproben in ng/ml rückgerechnet werden.

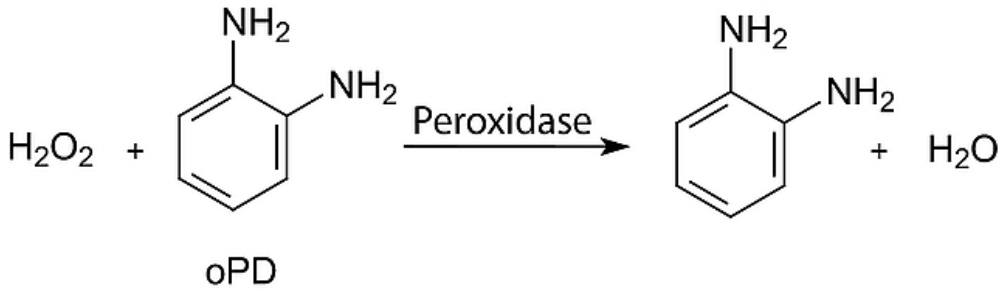


Abb. 14: o-Phenylenediamine (OPD) ist ein farbreaktives Substrat, das für ELISA geeignet ist, wenn horseradish peroxidase als Enzym zur Verfügung steht. Nach der Reaktion entsteht ein Produkt, das eine orange-braune Farbe annimmt. Dieses kann spektrophotometrisch bei 450nm nachgewiesen werden. Die OPD Reaktion kann mit 3N HCl oder 3 M H_2SO_4 gestoppt werden, dies kann bei 495nm ausgewertet werden. (https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1526?lang=de&region=DEjpg)

3.3.6 IL1ß-ELISA

Während des Chondrogenese Versuchs wurden zu den verschiedenen Erntezeitpunkten jeweils der Zellkulturüberstand abgenommen, um den Gehalt an IL1ß zu ermitteln. Für den Versuch wurde der DuoSet ELISA von R&D Systems für Human IL1ß/IL-1F2 verwendet.
Nach dem Sandwich-ELISA-Prinzip wurde die Platte zuerst mit dem Capture-Antikörper versehen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Standards und der Proben. Nach Zugabe des Detektions-Antikörpers wurde die Platte für 2 Stunden auf den Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 20 Minuten Inkubationszeit mit einem Streptavidin Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörper wurde ein Gemisch aus H_2O_2 und Tetramethylbenzidin hinzugefügt. Nachdem eine Blaufärbung in allen Standardproben sichtbar war, wurde die Reaktion mit einer Stoplösung beendet und die Fluoreszenzsignale im Tecan GENios Microplate Reader bei 450nm gemessen. Bei jedem Versuchsaufbau wurden ausgewählte Konzentrationen an IL1ß mitanalysiert. Anhand dieser Konzentrationen konnte anschließend auf die Konzentration der Versuchsproben in pg/ml rückgerechnet werden.

3.4 Durchflusszytometrie

Um eine Aussage treffen zu können, inwiefern die Stimulation mit SP und αCGRP Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der hMSCs hat, wurden die Zellen mit Hilfe des FACS Caliburs (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Zellzyklusuntersuchung wurden je eine Million Zellen auf sechs T-175 cm^2 Flaschen aufgeteilt. Nach 24 Stunden im Inkubator unter Standardbedingungen (wasserdampfgesättigt, 37°C, 5% CO_2) wurde ein FCS-Entzug durchgeführt, um die Zellen in der G0 Phase zu synchronisieren. Nachdem die Zellen zweimal mit PBS gespült worden waren, wurde ein DMEM (low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium) zugegeben. In den folgenden 48 Stunden wurden die Zellen mit dem gleichen Medium, aber mit Zugabe von 10% hitzestabilen Gibco FCS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und der Neurotransmittern SP und αCGRP in den Konzentrationen 10^{-8} und 10^{-10} M stimuliert. Nach 2 Tagen Stimulation erfolgte die Ernte der Zellen.

Die Zellen wurden mit jeweils 4ml einer 400-600IE/ml Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) vom Flaschenboden abgelöst (Monolayer), zweimal mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellzählgeräts (CEDEX, Roche, Penzberg, Deutschland) gezählt. Um die Zellen zu fixieren und ihre Zellmembran zu permeabilisieren wurde je 1 Million Zellen mit 1ml 70%-igem Methanol (-20°C) 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 1700xg pelletiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 425 µl PBS wieder resuspendiert. Es folgte ein RNA-Verdau bei dem 50µl RNAse A (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) einer 1mg/ml Stocklösung, (Endkonzentration: 50 µg/ml) für 20 Minuten bei 37°C zu den Zellen gegeben wurde Anschließend wurden 25 µl aus einer Propidiumiodid-Stocklösung (Stock: 1 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA) zu den Zellen gegeben. Propidiumiodid interkalierte dabei in die DNA der Zellen, wodurch anschießend im Durchflusszytometer die Verteilung der Zellen im Zellzyklus gemessen werden konnte. In der sogenannten G1-Phase (Gap-Phase) haben die Zellkerne einen einfachen vollständigen Chromosomensatz, in der S-Phase (Synthese-Phase) dagegen wird die DNA repliziert, und in der G2-Phase des Zellzykluses ist die Verdopplung der DNA abgeschlossen. Das Fluoreszenzsignal zeigt sich in der G2/M-Phase daher etwa doppelt so intensiv wie in der G1-Phase und kann bei einer Anregung von 488nm gemessen werden. Um eine mögliche Eigenfluoreszenz der Zellen auszuschließen, wurde eine ungefärbte Probe der mesenchymalen Stammzellen als negativ-Kontrolle mitgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm *FlowJo.*

3.5 Alcianblaufärbung

Um eine histologische Färbung durchführen zu können, wurden die halbierten Fibringele nach der Ernte zuerst für 24 Stunden in 4%-Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in einer TissueTek-Lösung (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) fixiert und bei -20°C gelagert. Für die Färbung wurden 10µm dünne Schnitte aus den Fibringelen mit dem Gefriermikrotom angefertigt und auf Objektträger gebracht.

Die Alcianblaufärbung macht sich den Umstand zunutze, dass bei der chondrogenen Differenzierung saure Proteoglykane und Polysaccharide von den Zellen produziert werden. Alcianblau färbt sulfatierte GAG wie sie in der EZM des Knorpels vorkommen. Gleichzeitig mit der Alcianblaufärbung wurde eine Färbung mit Weigert's Hämatoxylin (HE) Lösung durchgeführt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Dieses Reagenz ist eine Mischung aus:
Lösung A 3,5 g Hämatoxylin (C.I.75290; Applichem, Omaha, USA) gelöst in 350 ml Ethanol 96 % und **Lösung B** 5,25 g Eisen(III)-Chlorid (Fluka, Milwaukee, USA) gelöst in 350 ml H_2O (dest.) und in 3,5 ml konzentrierter HCl (Applichem, Omaha, USA).
Nach 15-minütiger Inkubationszeit in der Weigert´s HE-Lösung wurden die Schnitte zuerst mit destilliertem und anschließend unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Danach wurde für 3 Minuten 3 %-ige Essigsäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) (pH 2,5) auf die Schnitte gegeben.
Die Färbung mit Alcianblau erfolgte im Anschluss für 30 Minuten. Dafür wurde eine 1% -ige Alcianblau Lösung (C.I.74240; Serva, Heidelberg, Deutschland) in 3 %-iger Essigsäure frisch hergestellt. Es folgte wieder ein Waschschritt für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser und anschließend unter destilliertem Wasser. Nachdem die Schnitte 5 min in PBS inkubiert wurden, konnten sie mit Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt und mikroskopiert werden.

3.6 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden anschließend statistisch mit Hilfe des *GraphPad Prism 9.0.0* Programmes und verschiedenen Signifikanztests analysiert. Dabei wurde mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests die Signifikanz zwischen zwei Gruppen bewertet. In Einzelfällen wurde ein ungepaarter t-Test benutzt, was dann in den Abbildungslegenden angegeben wurde. Zur graphischen Abbildung der Genexpressionsdaten wurde eine logarithmische Darstellung gewählt. Die Berechnungen des Logarithmus fanden zur Basis 2 statt.
Für die Westernblotauswertung wurde vorher noch eine Analyse der Grautöne der Banden mit Hilfe von *Photoshop CS 5.1* durchgeführt.
Die Auswertung der Durchflusszytometrieergebnisse erfolgte mit dem Programm *FlowJo*. Die einzelnen Phasen wurden pro Versuch mit einem mathematischen Modell ausgewertet (Dean-Jett-Fox).

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von SP und αCGRP während der chondrogenen Differenzierung von hMSC

4.1.1 Einfluss von SP und αCGRP auf die Genexpression ausgewählter Marker während der chondrogenen Differenzierung von hMSC

Die chondrogene Differenzierung ist ein komplexer Prozess, an dem verschiedene Faktoren beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit wurden im Verlauf der Chondrogenese (hMSC wurden in Fibringelen mit chondrogenem Differenzierungsmedium kultiviert) 11 verschiedene Gene auf ihre Expressionsänderung durch Stimulation mit SP oder αCGRP untersucht. Dabei lassen sich die Gene verschiedenen Gruppen zuordnen:

- Katabole Faktoren: IL6, IL8, TNFα (4.1.1.1)
- Chondrogene Markergene: COL1A1, COL2A1, COL3A1, COL10A1, SOX9 (4.1.1.2)
- Anti-Apoptosemarker: BCL2 (4.1.1.3)
- Wachstumsfaktoren: BMP6, FGF2 (4.1.1.4)

Proben wurden an Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 der chondrogenen Differenzierung genommen, wobei die Zellen täglich mit SP bzw. αCGRP stimuliert wurden. Für die Auswertung wurden zum einen die Veränderungen der Genexpression durch die Stimulationen mit SP und αCGRP auf die unstimulierte Kontrolle bezogen. Zum anderen diente die Tag 7-Probe als Referenz um die Veränderungen an den Tag 14, Tag 21 und Tag 28 im Verlauf darzustellen, jeweils mit oder ohne Zugabe der beiden Neuropeptide.
In dieser Arbeit definierten wir eine frühe Phase der Differenzierung den Zeitraum zwischen den Erntezeitpunkten Tag 7 und Tag 14, während als Spätphase der Differenzierung der Zeitraum zwischen Tag 21 und Tag 28 bezeichnet wurden.

4.1.1.1 Genexpressionsänderung proinflammatorischer Zytokine unter Einfluss von SP und αCGRP

In der Gruppe der katabolen Zytokine konnten für IL8 in der frühen chondrogenen Differenzierung und für IL6 und TNFα vor allem in einer späteren Phase der Differenzierung signifikante Änderungen der Genexpression unter Einfluss von SP bzw. αCGRP gemessen werden.
Eine verringerte Genexpression von IL6 lässt sich unter Stimulation mit 10^{-10} M αCGRP an Tag 21 nachweisen (Abb. 15A).
10^{-8} M SP erhöht die Expression von IL6 an Tag 28 dagegen signifikant im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 15B).

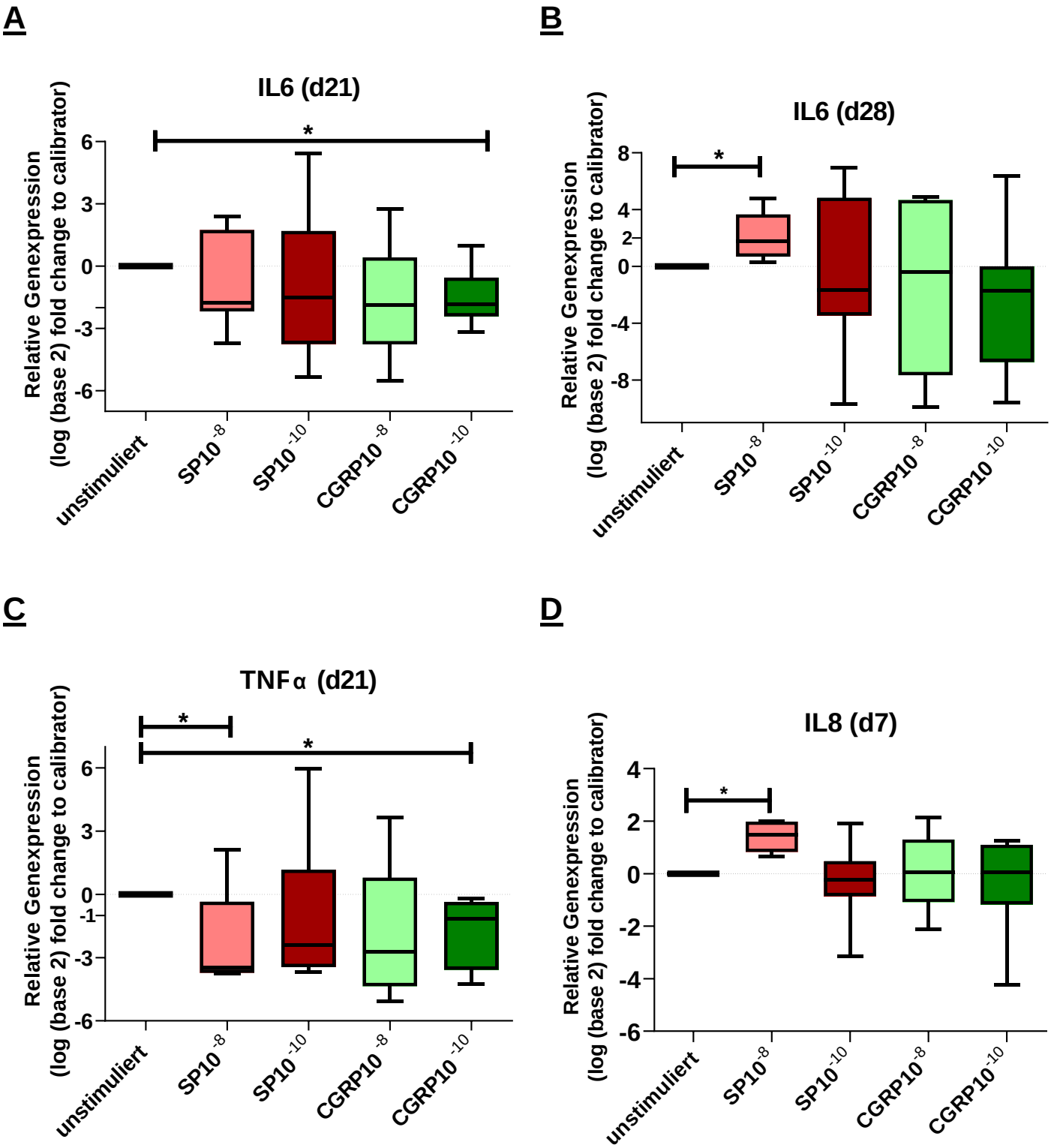


Abb.15: Genexpressionsänderung von proinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit 10^{-8} M und10^{-10} M SP sowie 10^{-8} M und 10^{-10} M αCGRP in chondrogen differenzierenden hMSC. Die unstimulierte Kontrolle dient in allen Abbildungen als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.
Abbildung **A** zeigt die Genexpressionsänderung von **IL6** an Tag 21. Unter der Stimulation von 10^{-10} M αCGRP zeigte sich eine verminderte Genexpression.
In Abbildung **B** ist die Genexpressionsänderung von **IL6** an Tag 28 dargestellt. Unter 10^{-8} M SP Stimulation zeigte sich eine verstärkte Genexpression.

Abbildung **C** zeigt die Genexpressionsänderung von **TNFα** an Tag 21. Unter Einfluss von 10^{-8} M SP und 10^{-10} M αCGRP ergab sich eine verminderte Genexpression.
In Abbildung **D** wird die Genexpressionsänderung von **IL8** an Tag 7 dargestellt. Unter 10^{-8} M SP Stimulation ergab sich eine verstärkte Genexpression.

Die Genexpression von TNFα wurde sowohl durch die Stimulierung mit SP in einer hohen Konzentration (10^{-8} M), wie auch durch αCGRP in einer geringen Konzentration (10^{-10} M) an Tag 21 der Differenzierung signifikant reduziert (Abb. 15C).
IL8 zeigte durch Stimulation mit 10^{-8} M SP an Tag 7 der chondrogenen Differenzierung eine signifikante Erhöhung der Genexpression (Abb. 15D).
Wird bei der Auswertung der Daten nicht die unstimulierte Kontrolle, sondern die Ergebnisse an Tag 7 als Referenz betrachtet, kann der zeitliche Verlauf der Genexpression während der chondrogenen Differenzierung (Tag 14, Tag 21, Tag 28) mit bzw. ohne Zugabe der Neuropeptide SP oder αCGRP dargestellt werden.
Die Expression von IL6 während der chondrogenen Differenzierung zeigte unter unstimulierten Bedingungen an Tag 21 eine signifikante Reduktion verglichen mit Tag 7. Diesen Abfall der Genexpression während der Differenzierung, der bei allen 7 untersuchten Chargen-Stammzellen deutlich war, war nicht zu messen, wenn die Zellen mit SP bzw. mit αCGRP stimuliert wurden (Abb.16).

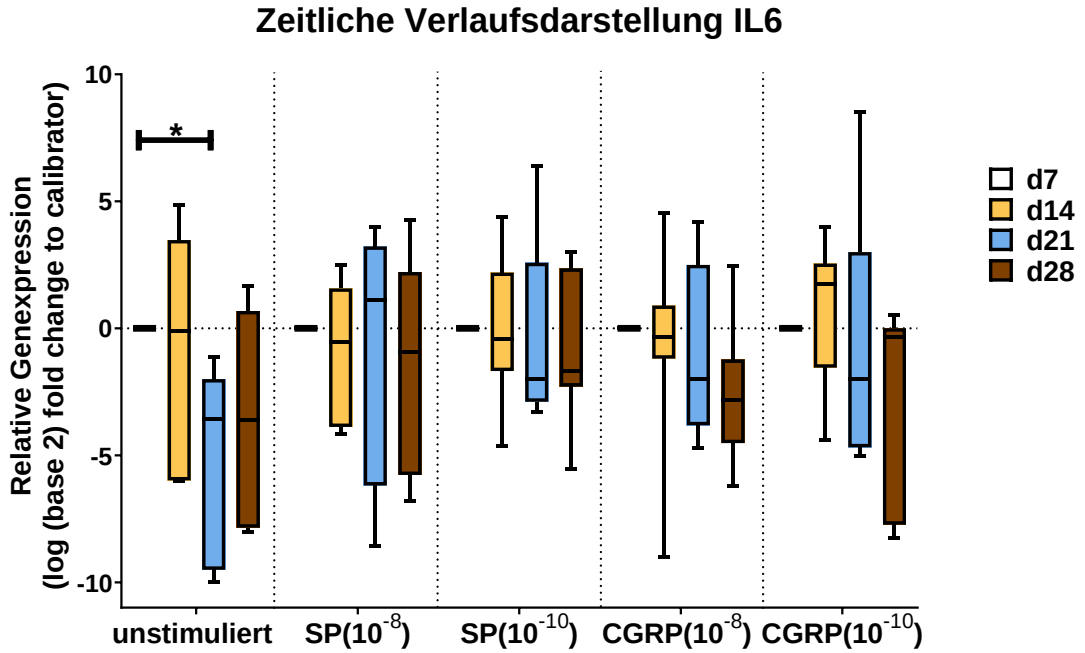


Abb. 16: Relative Genexpression von **IL6** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Die unstimulierte Kontrolle zeigte eine Verminderung der Genexpression an Tag 21. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, $n=7$. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

Die Genexpression von IL8 im Verlauf der chondrogenen Differenzierung zeigte bei der unstimulierten Kontrolle eine signifikante Reduktion der Genexpression an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7.

Durch die Stimulationen mit 10^{-8} M SP, 10^{-10} M SP und 10^{-8} M αCGRP zeigte sich hingegen bereits an Tag 14 eine signifikant verringerte Genexpression von IL8, und zusätzlich eine signifikante Reduktion an Tag 28, analog zu den unstimulierten Kontrollen. Nach Stimulation von 10^{-10} M αCGRP kann für Tag 14 eine signifikante Reduktion der IL8 Genexpression im Vergleich zu Tag 7 gezeigt werden. Die beiden Neuropeptide SP und αCGRP scheinen also die Abnahme der IL8 Genexpression zu beschleunigen (Abb. 17).

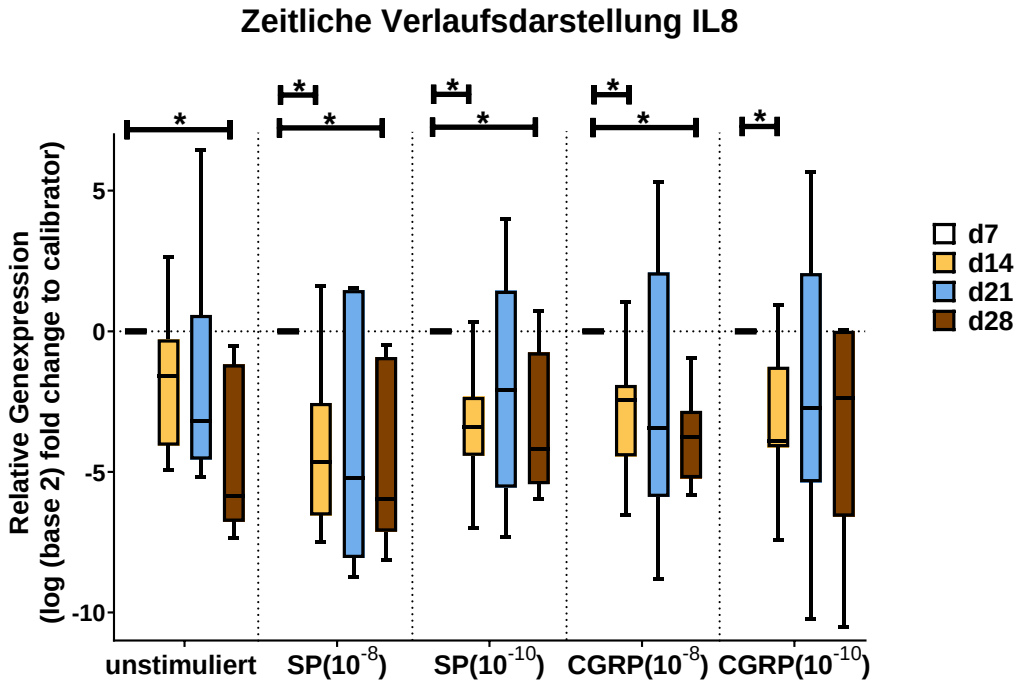


Abb. 17: Relative Genexpression von **IL8** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Für die unstimulierte Kontrolle ergab sich eine Verminderung der Genexpression an Tag 28. Unter Stimulation von 10^{-8} M SP, 10^{-10} M SP und 10^{-8} M αCGRP zeigte sich eine Reduktion der IL8 Produktion an Tag 14 und Tag 28. Unter Stimulation von 10^{-10} M αCGRP war die Genexpression an Tag 14 vermindert. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, $n=7$. Es wird der Median +/- SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

Die Genexpressionsdaten von TNFα ergaben ohne Zusatz von SP und αCGRP keine signifikante Veränderungen im Verlauf der chondrogenen Differenzierung. Eine hohe Konzentration von SP bzw. von αCGRP (jeweils 10^{-8} M) bewirkte dagegen jeweils eine signifikante Änderung der TNFα Expression an Tag 14 verglichen mit Tag 7. So ließ sich nach 10^{-8} M SP Stimulation eine Reduktion der Genexpression an Tag 14 nachweisen und nach 10^{-8} M αCGRP Stimulation eine vermehrte Genexpression an Tag 14 (Abb. 18).

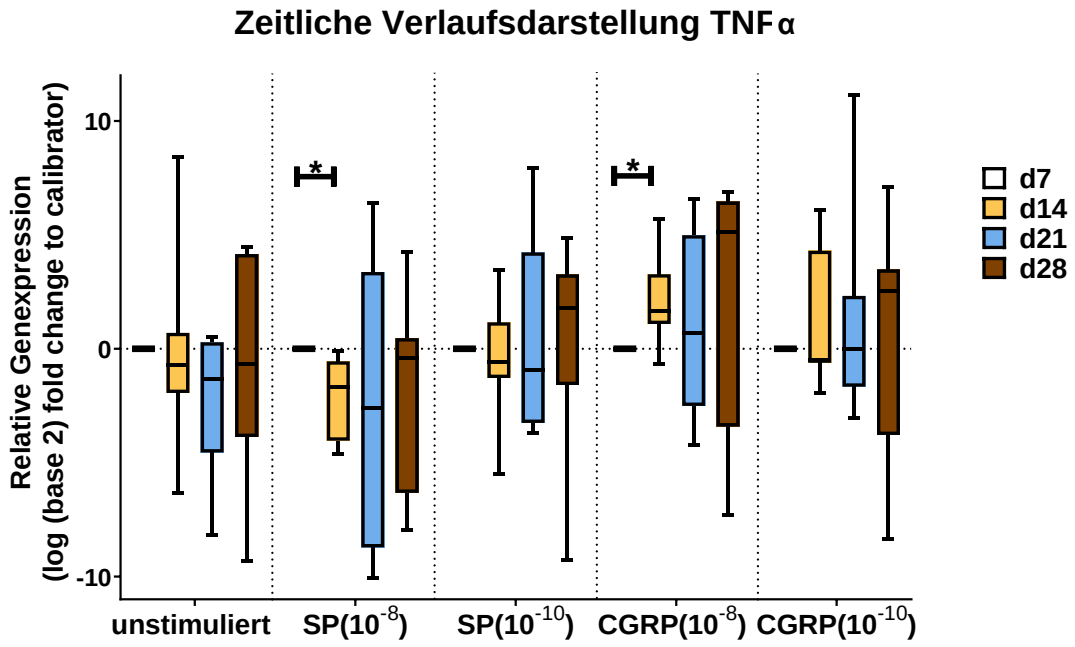


Abb. 18: Relative Genexpression von **TNFα** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Unter Stimulation von SP 10^{-8} M wurde an Tag 14 vermindert TNFα nachgewiesen. Unter 10^{-8} M αCGRP zeigte sich eine verstärkte Genexpression an Tag 14. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.1.1.2 Die Expression chondrogener Markergene unter Einfluss von SP und αCGRP

4.1.1.2.1 SOX 9

SOX9 zeigte an Tag 21 und Tag 28 der Differenzierung unter Stimulation mit 10^{-10} M SP eine signifikante Reduktion der Genexpression verglichen mit unstimulierten hMSC.

Ebenso führte die αCGRP-Stimulierung mit beiden Konzentrationen (10^{-8} M und 10^{-10} M) an Tag 28 zu einer verminderten Expression der SOX9-mRNA (Abb. 19A und 19B).

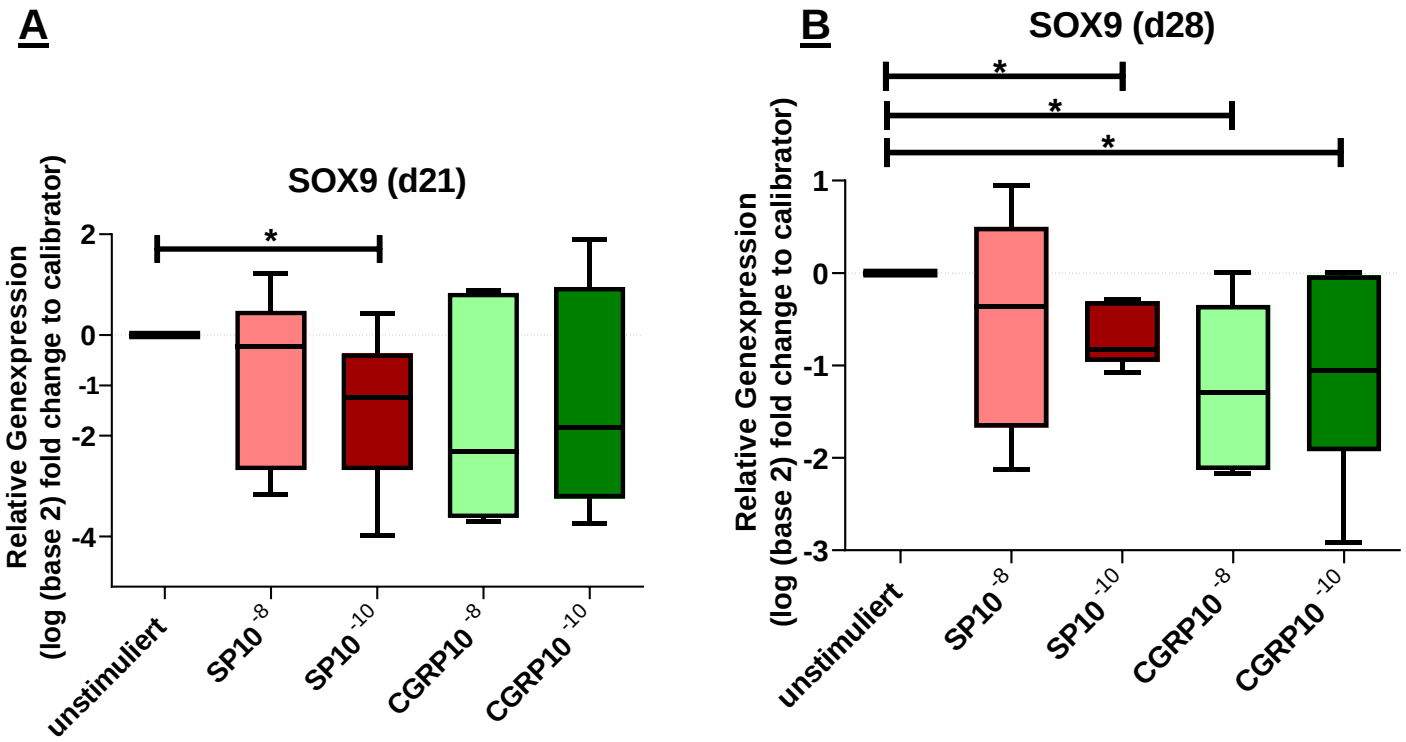


Abb.19: Genexpressionsänderung von **SOX9** unter Stimulation von 10^{-8} M SP, 10^{-10} M SP, 10^{-8} M αCGRP und 10^{-10} M αCGRP. In beiden Darstellungen dienten unstimulierte hMSC als Kontrolle (Kalibrator), $p<0,05$, n=7, Werte der relative Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.
Abb. A: Unter 10^{-10} M SP Stimulation ergab sich eine verminderte Genexpression von SOX9 an Tag 21.
Abb. B: Nach 10^{-10} M SP -, 10^{-8} M αCGRP - und 10^{-10} M αCGRP–Stimulation ließ sich eine verminderte Genexpression von SOX9 an Tag 28 nachweisen.

Das mRNA Level von SOX9 blieb in der unstimulierten Gruppe während der chondrogenen Differenzierung auf einem gleichbleibenden Niveau, während sich für die 10^{-8} M αCGRP Stimulation eine signifikante Reduktion der Genexpression an Tag 28 im Verlauf zeigte (Abb.20). In den anderen Versuchsgruppen (SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M) und αCGRP (10^{-10} M)) blieb die mRNA-Menge von SOX9 ohne signifikante Änderung.

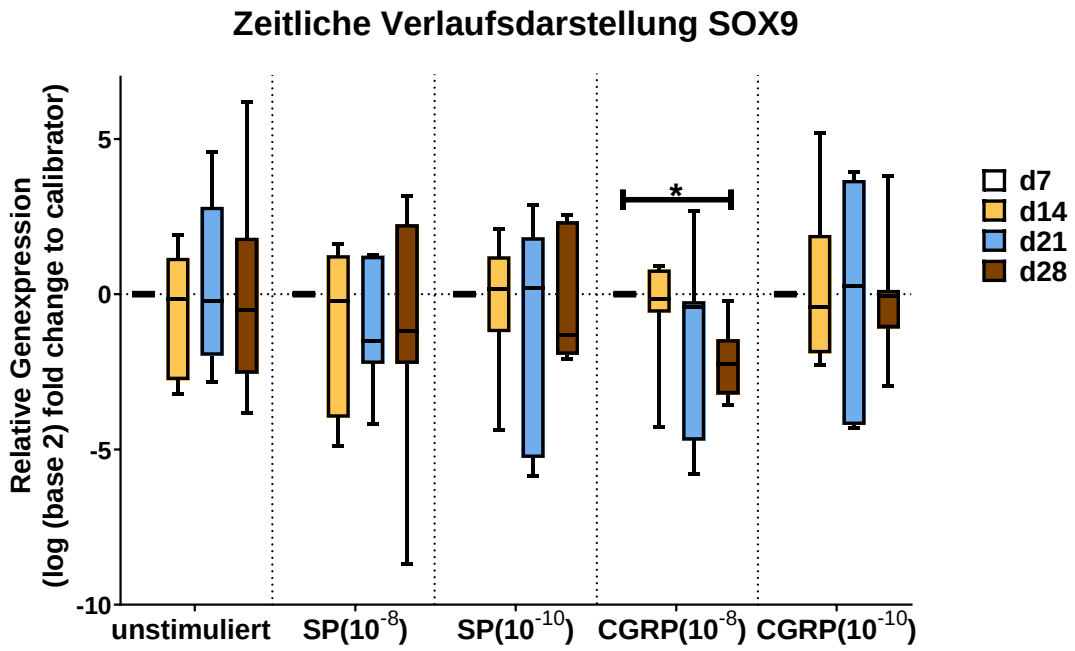


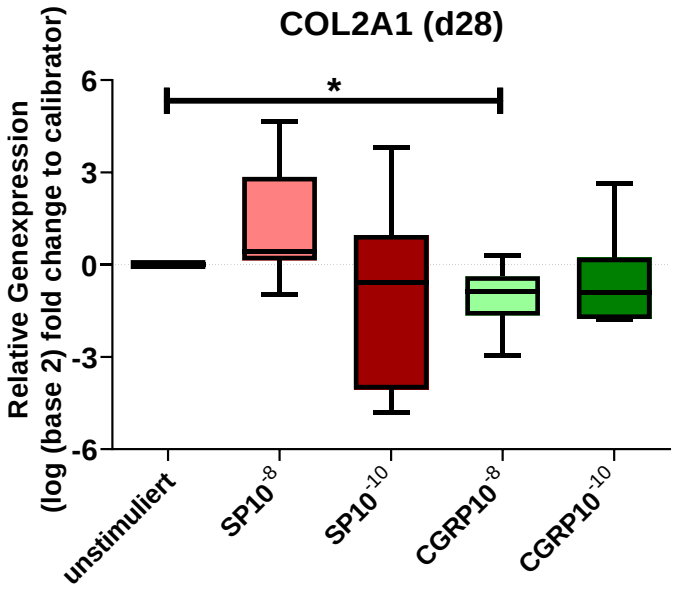
Abb. 20: Relative Genexpression von **SOX9** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Unter Stimulation von αCGRP (10^{-8} M) zeigte sich eine Reduktion der Genexpression an Tag 28. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.1.1.2.2 COL2A1 und COL10A1

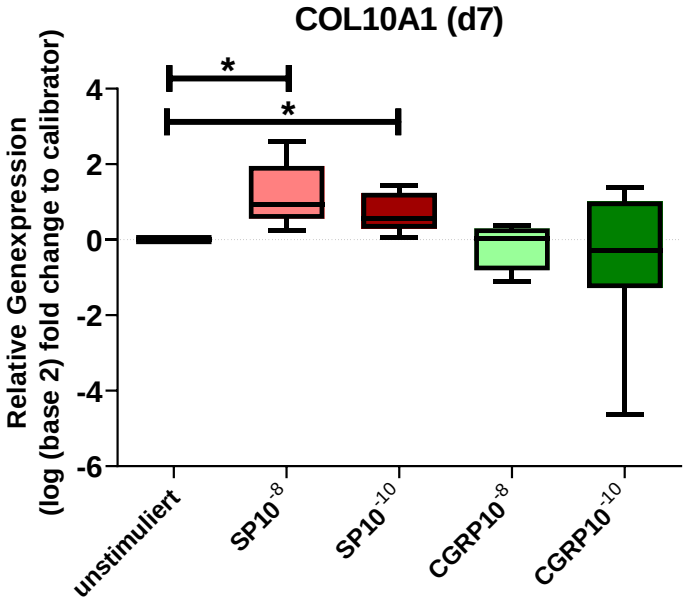
Ein weiteres klassisches Markergen für die Chondrogenese stellt COL2A1 dar. Differenzieren mesenchymale Stammzellen zu Chondrozyten, wird dabei vermehrt Kollagen II gebildet. Durchlaufen die Chondrozyten den Prozess der Hypertrophie, nehmen sie bis an das 10 fache an Zellvolumen zu und produzieren nun vermehrt Kollagen X anstelle von Kollagen II.

An Tag 28 ließ sich nach Stimulation mit αCGRP (10^{-8} M), sowohl eine signifikante Reduktion der Genexpression von COL2A1, als auch von COL10A1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachweisen (Abb. 21 A, C). Nach Stimulation mit beiden Konzentrationen von SP (10^{-8} M und 10^{-10} M) ergab sich bereits nach 7 Tagen eine signifikante Erhöhung der Genexpression von COL10A1 (Abb. 21B).

21A



21B



21C

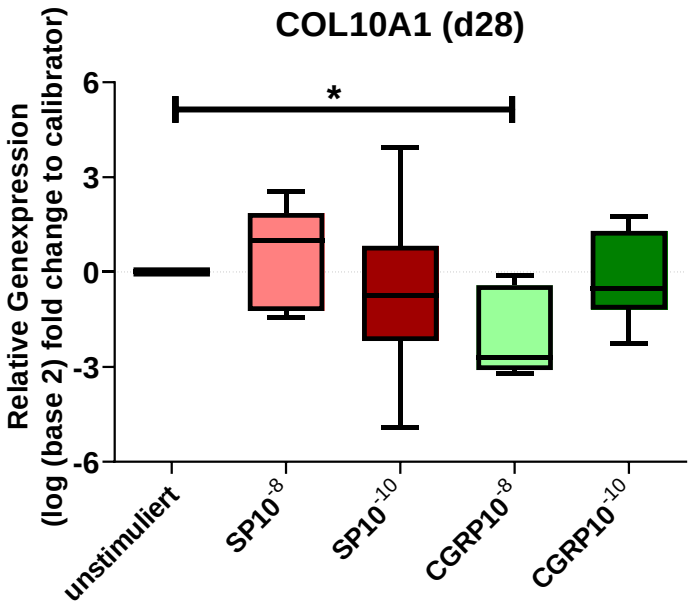


Abb. 21 A-C: Genexpressionsänderung von **COL2A1** und **COL10A1** unter Stimulation von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (0^{-10} M).
In allen Darstellungen diente eine unstimulierte Kontrolle als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/- SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.
Abb. 21 A: Unter Stimulation von αCGRP (10^{-8} M) zeigte sich eine erniedrigte Genexpression von **COL2A1** an Tag 28.
Abb. 21 B: **COL10A1** wurde an Tag 7 verstärkt exprimiert nach beiden SP-Stimulationen.
Abb. 21 C: An Tag 28 zeigte sich für **COL10A1** eine verminderte Expression nach Stimulation mit αCGRP (10^{-8} M).

In unstimulierten hMSC ließ sich während der chondrogenen Differenzierung eine signifikante Zunahme der COL2A1 Genexpression zu allen Zeitpunkten (Tag 14, Tag 21,

Tag 28) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 7) nachweisen. Nach Stimulation mit SP (10^{-10} M) ergab sich ebenfalls eine signifikante Verstärkung der Genexpression an Tag 14, Tag 21 und Tag 28. Sowohl für SP (10^{-8} M) als auch für αCGRP (10^{-8} M) konnte an Tag 28 eine signifikant verstärkte Genexpression nachgewiesen werden.
Unter der Stimulation mit αCGRP 10^{-10} M konnte eine starke Erhöhung der Genexpression an Tag 14 und Tag 21 nachgewiesen werden (Abb. 22).

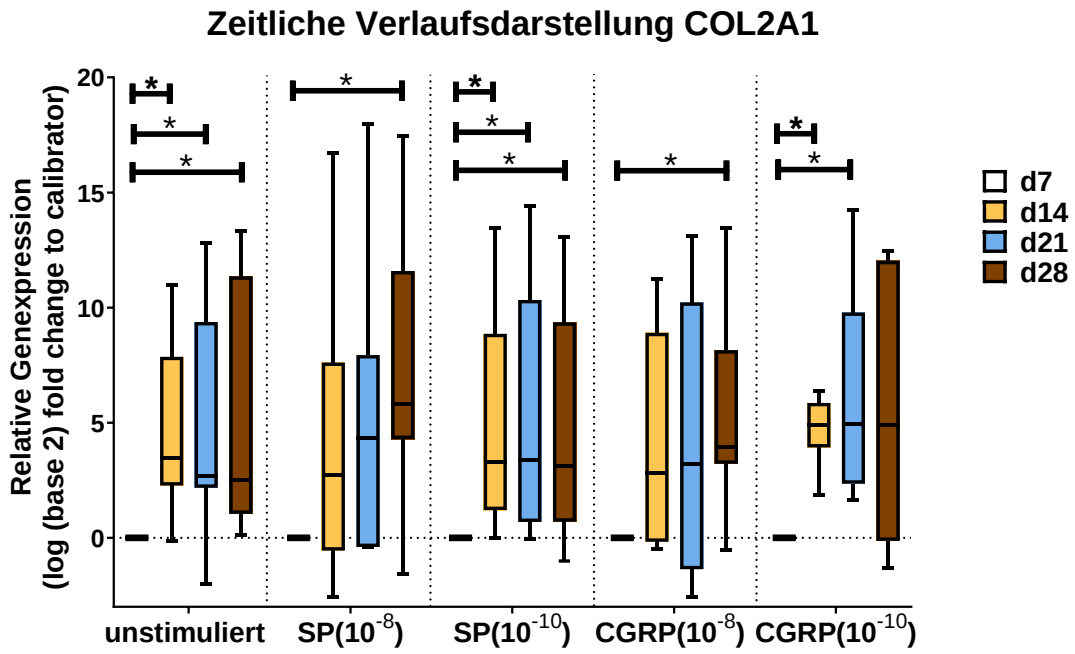


Abb. 22: Relative Genexpressionsänderung von **COL2A1** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Die unstimulierte Kontrolle zeigte eine signifikante Erhöhung der Genexpression am Tag 14, Tag 21 und Tag 28. Unter Stimulation von SP (10^{-8} M) zeigte sich eine signifikante Erhöhung an Tag 28 und eine Stimulation mit SP (10^{-10} M) führt zu einer verstärkten Genexpression am Tag 14, Tag 21 und Tag 28. Unter Stimulation von αCGRP (10^{-8} M) zeigte sich eine Verstärkung der Genexpression an Tag 28 und unter αCGRP (10^{-10} M) ergab sich eine vermehrte Genexpression am Tag 14 und Tag 21. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, $n=7$. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

In der unstimulierten Kontrolle konnte eine signifikante Erhöhung der Genexpression von COL10A1 an Tag 14 und Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 gezeigt werden. Für SP (10^{-8} M) und SP (10^{-10} M) ließ sich an Tag 21 und Tag 28 eine vermehrte Genexpression darstellen.
Unter Einfluss von αCGRP (10^{-8} M) konnte keine signifikante Änderung des COL10A1 mRNA Levels im Verlauf der chondrogenen Differenzierung im Vergleich zu Tag 7 gemessen werden. Unter der Stimulation mit αCGRP (10^{-10} M) konnte eine Erhöhung der COL10A1 Genexpression an Tag 14 und an Tag 21 nachgewiesen werden (Abb. 23).

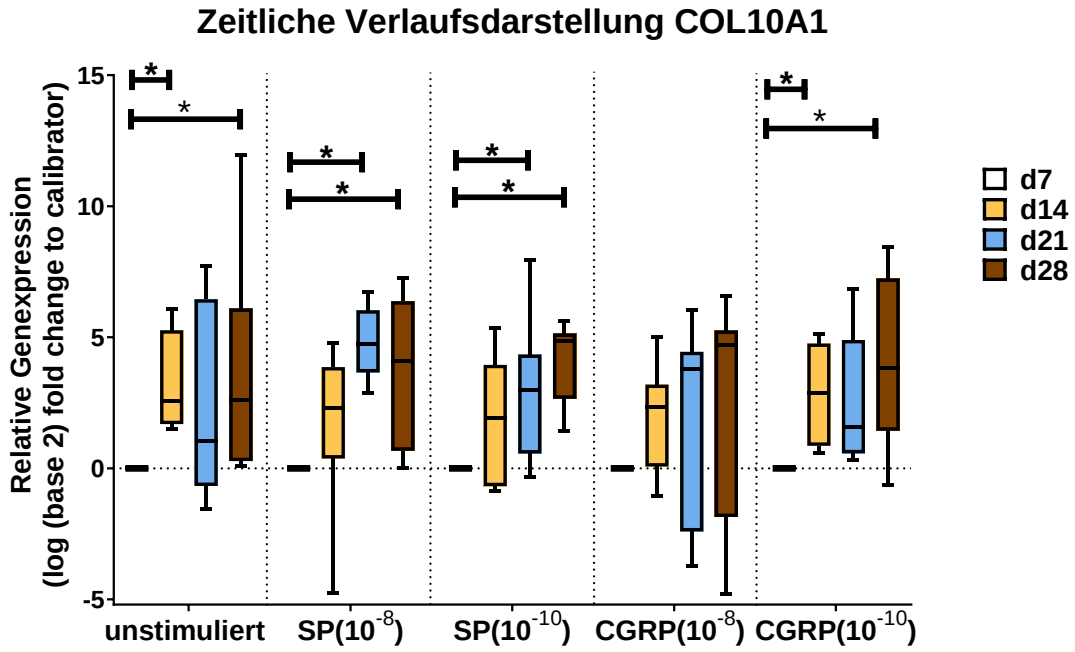


Abb. 23: Relative Genexpression von **COL10A1** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Die unstimulierte Kontrolle zeigte eine verstärkte Genexpression an Tag 14 und Tag 28. Unter Stimulation von SP (10^{-8} M) und SP (10^{-10} M) ergab sich eine vermehrte Genexpression an Tag 21 und Tag 28. Unter Stimulation von αCGRP (10^{-10} M) ließ sich ebenfalls eine Verstärkung an Tag 14 und Tag 21 nachweisen. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7, Werte der relativen Genexpression sind logarithmisch zur (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.1.1.2.3 COL1A1 und COL3A1

Zu den Markern der mesenchymalen Stammzellen zählen COL1A1 und COL3A1.

Für COL1A1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der unstimulierten Probe und den mit Neurotransmitter stimulierten Proben an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (Daten hier nicht gezeigt).

Im Verlauf ergab sich allerdings für die unstimulierte Kontrolle an Tag 14 und für SP (10^{-8} M) an Tag 21 eine erhöhte Genexpression von COL1A1 im Vergleich zur jeweiligen Tag 7 Kontrolle. Nach Stimulation mit SP (10^{-10} M) und αCGRP (10^{-8} M und 10^{-10} M) konnten keine signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf gemessen werden (Abb. 24).

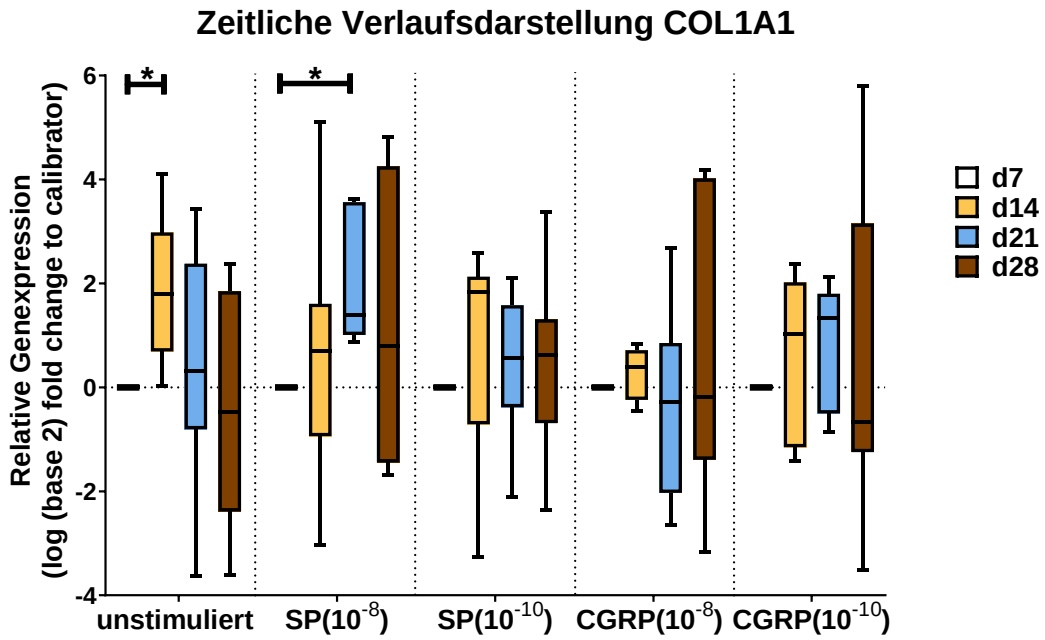


Abb. 24: Relative Genexpression von **COL1A1** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Die unstimulierte Kontrolle zeigte eine Verstärkung der Genexpression an Tag 14. Unter Stimulation von SP (10^{-8} M) ergab sich eine verstärkte Genexpression an Tag 21. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

Durch Stimulation mit SP (10^{-10} M) konnte an Tag 14 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine verminderte Genexpression von COL3A1 festgestellt werden (Abb. 25). An den anderen Messzeitpunkten (Tag 7, Tag 21 und Tag 28) kam es zu keiner signifikanten Änderung der COL3A1 Expression nach Zugabe eines der beiden Neuropeptide (Daten nicht gezeigt).

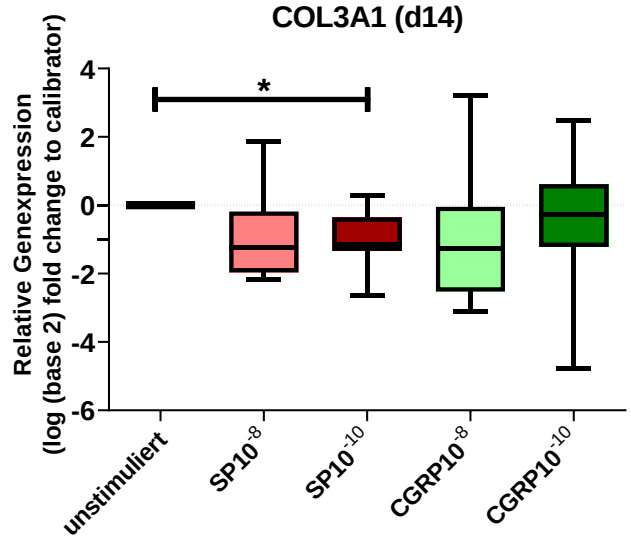


Abb. 25: Genexpressionsänderung von **COL3A1** unter Stimulation von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). An Tag 14 zeigte sich unter dem Einfluss von SP (10^{-10} M) eine verminderte Genexpression. In dieser Darstellung diente eine unstimulierte Kontrolle als Kalibrator, $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

Unter unstimulierten Bedingungen wurde für COL3A1 eine signifikante Erhöhung der Genexpression an Tag 14 im Vergleich zu Tag 7 gemessen. Die Stimulationen mit SP bzw. αCGRP hatten keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression im Verlauf (Abb.26).

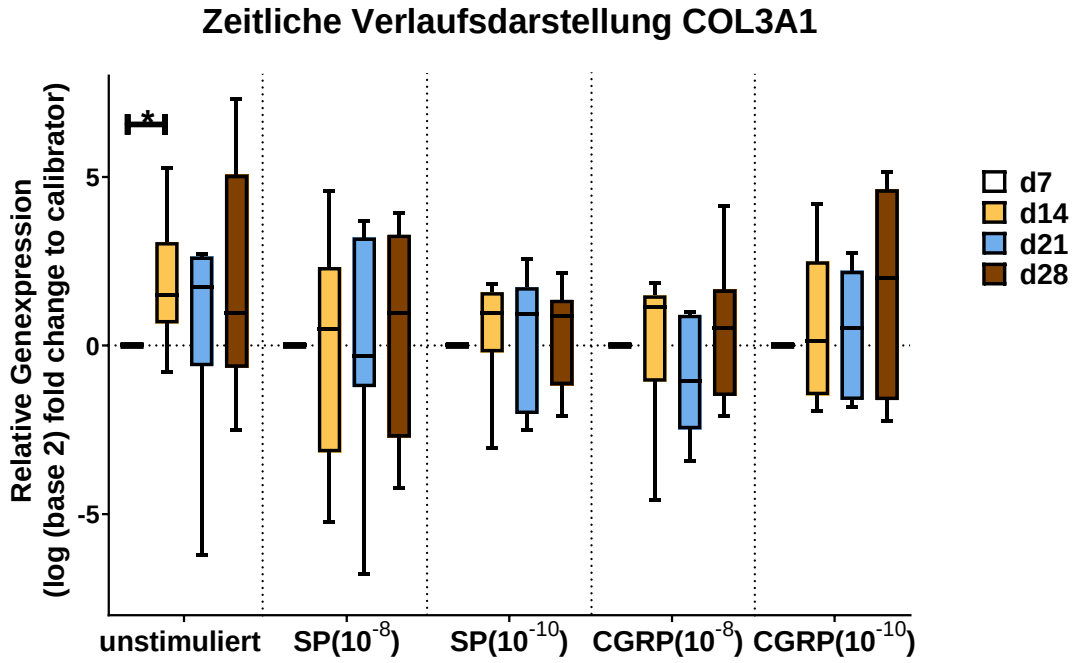


Abb. 26: Relative Genexpressionsänderung von **COL3A1** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Die unstimulierte Kontrolle zeigte eine Verstärkung der Genexpression an Tag 14. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.1.1.3 Die Expression des Anti-Apoptose-Markergens BCL2 unter Einfluss von SP und αCGRP

An Tag 28 der chondrogenen Differenzierung ließ sich eine signifikant verminderte Genexpression von BCL2 unter dem Einfluss von SP (10^{-10} M) und αCGRP (10^{-10} M) nachweisen (Abb. 27). An Tag 7, Tag 14 und Tag 21 ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von BCL2 im Vergleich zu unstimulierten Gruppe, weshalb die Daten nicht dargestellt werden.

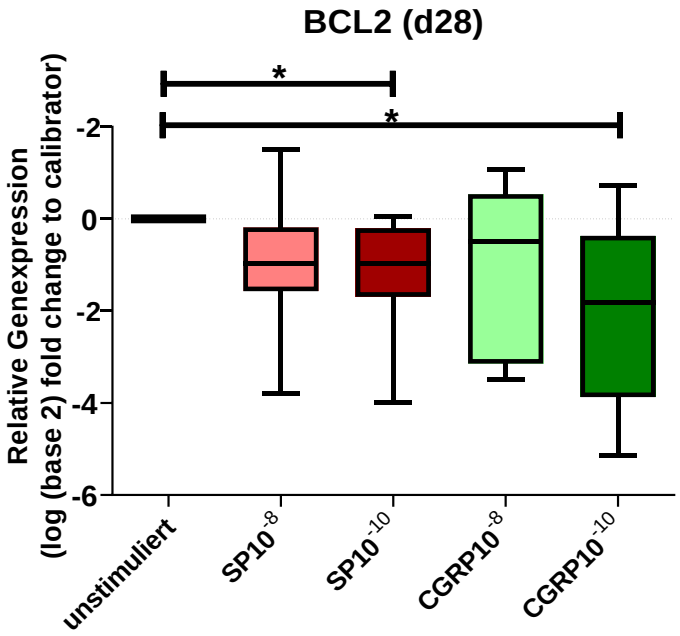


Abb. 27: Genexpressionsänderung von **BCL2** nach Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M) an Tag 28. Nach Stimulation mit 10^{-10} M SP und 10^{-10} M αCGRP zeigte sich eine verminderte Genexpression. Eine unstimulierte Kontrolle diente als Kalibrator, $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

Für unstimulierte hMSC konnte im zeitlichen Verlauf der Differenzierung sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21 im Vergleich zu Tag 7 eine signifikant erhöhte Genexpression von BCL2 nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu, zeigte sich unter den SP- Stimulationen (10^{-8} M und 10^{-10} M) jeweils nur an Tag 21 und durch αCGRP Stimulationen (10^{-8} M und 10^{-10} M) eine erhöhte Expression jeweils nur an Tag 14 (Abb. 28).

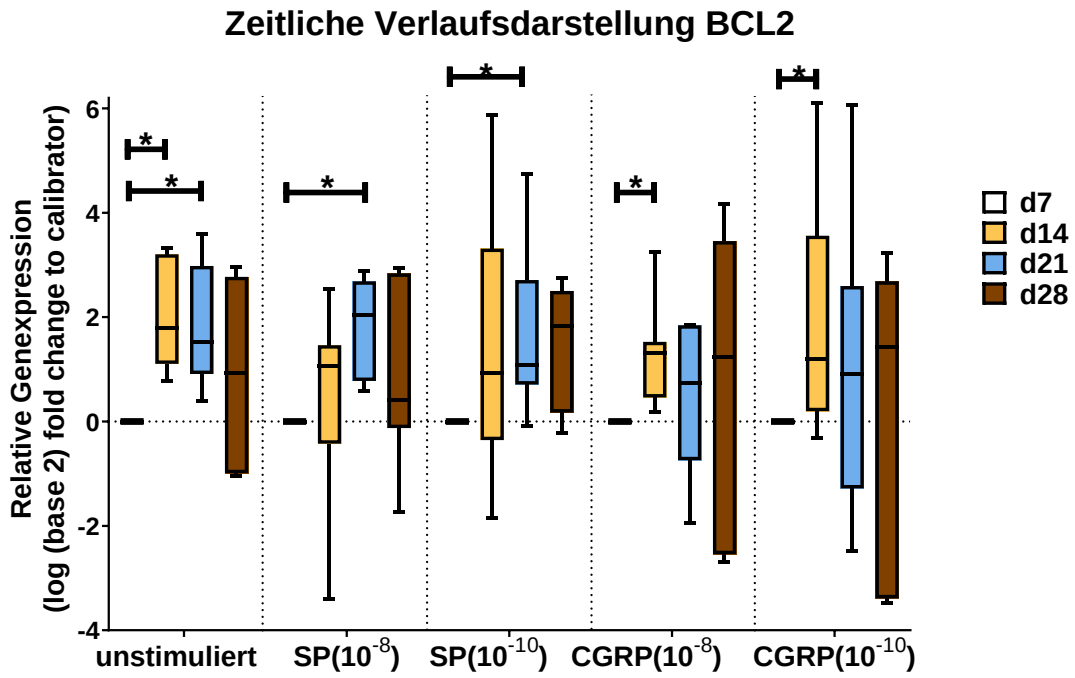


Abb. 28: Relative Genexpression von **BCL2** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Die unstimulierte Kontrolle zeigte eine Erhöhung der Genexpression an Tag 14 und Tag 21. Nach Stimulation mit SP (10^{-8} M und 10^{-10} M) ergab sich eine verstärkte Genexpressionen an Tag 21, während nach Stimulation von αCGRP (10^{-8} M und 10^{-10} M) eine verstärkte Genexpression an Tag 14 nachzuweisen war. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7. Es wird der Median +/-SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.1.1.4 Die Expression der Wachstumsfaktoren FGF2 und BMP6 unter Einfluss von SP und αCGRP

Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ergaben sich sowohl für die Genexpression von FGF2 als auch für die Genexpression von BMP6 zu keinem Zeitpunkt signifikante Änderungen (Daten nicht gezeigt).

Auch im Verlauf konnten keine signifikanten Änderungen der Genexpression von BMP6 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Stimulation mit SP (10^{-8} M) konnte im zeitlichen Verlauf an Tag 14 eine signifikant verminderte Genexpression von FGF2 im Vergleich zu Tag 7 dokumentiert werden (Abb. 29).

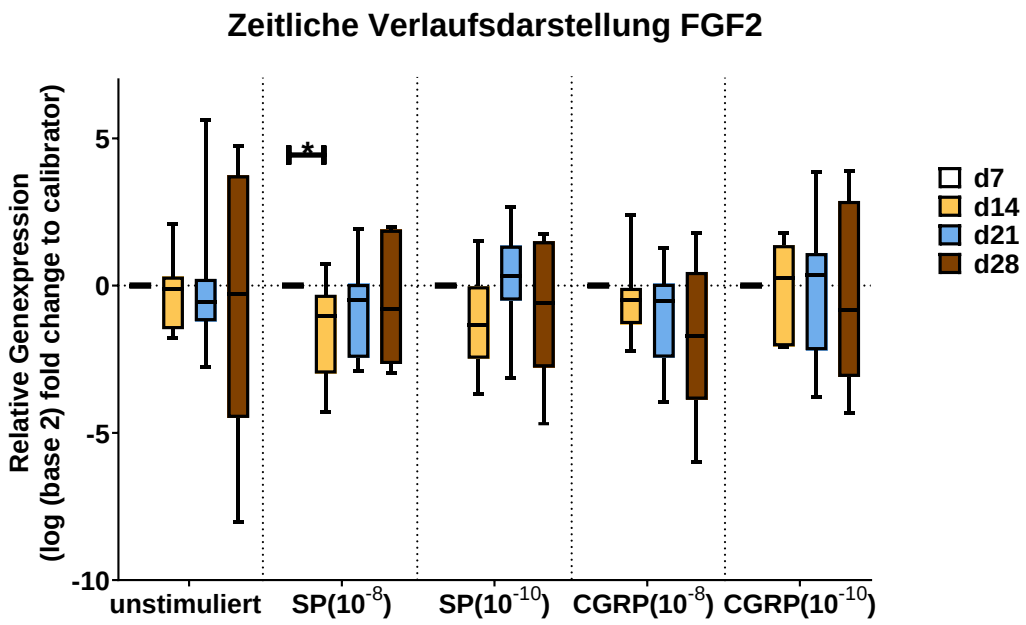


Abb. 29: Relative Genexpression von **FGF2** im Verlauf von Tag 7 bis Tag 28. Dargestellt sind eine unstimulierte Kontrolle und die Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Nach Stimulation mit SP (10^{-8} M) zeigte sich eine verminderte Genexpression von FGF2 an Tag 14. Tag 7 diente jeweils als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=7, Es wird der Median +/- SEM der relativen Genexpression logarithmisch (zur Basis 2) dargestellt. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.1.2 Veränderungen in der GAG-Produktion nach Stimulation mit SP und αCGRP

Um zu untersuchen, inwiefern die Stimulationen mit SP und αCGRP Einfluss auf die Produktion von Makromolekülen in der EZM nimmt, wurde der GAG-Gehalt an Tag 7, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 untersucht. An Tag 7, Tag 14 und Tag 21 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bzgl. des GAG-Gehalts nach SP bzw. αCGRP Stimulationen gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Allerdings konnte an Tag 28 nachgewiesen werden, dass nach Stimulierung mit αCGRP (10^{-8} M) der Gehalt an GAGs im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant erniedrigt war (Abb. 30).

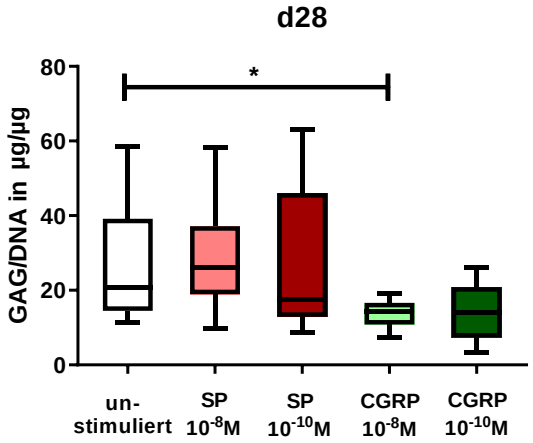
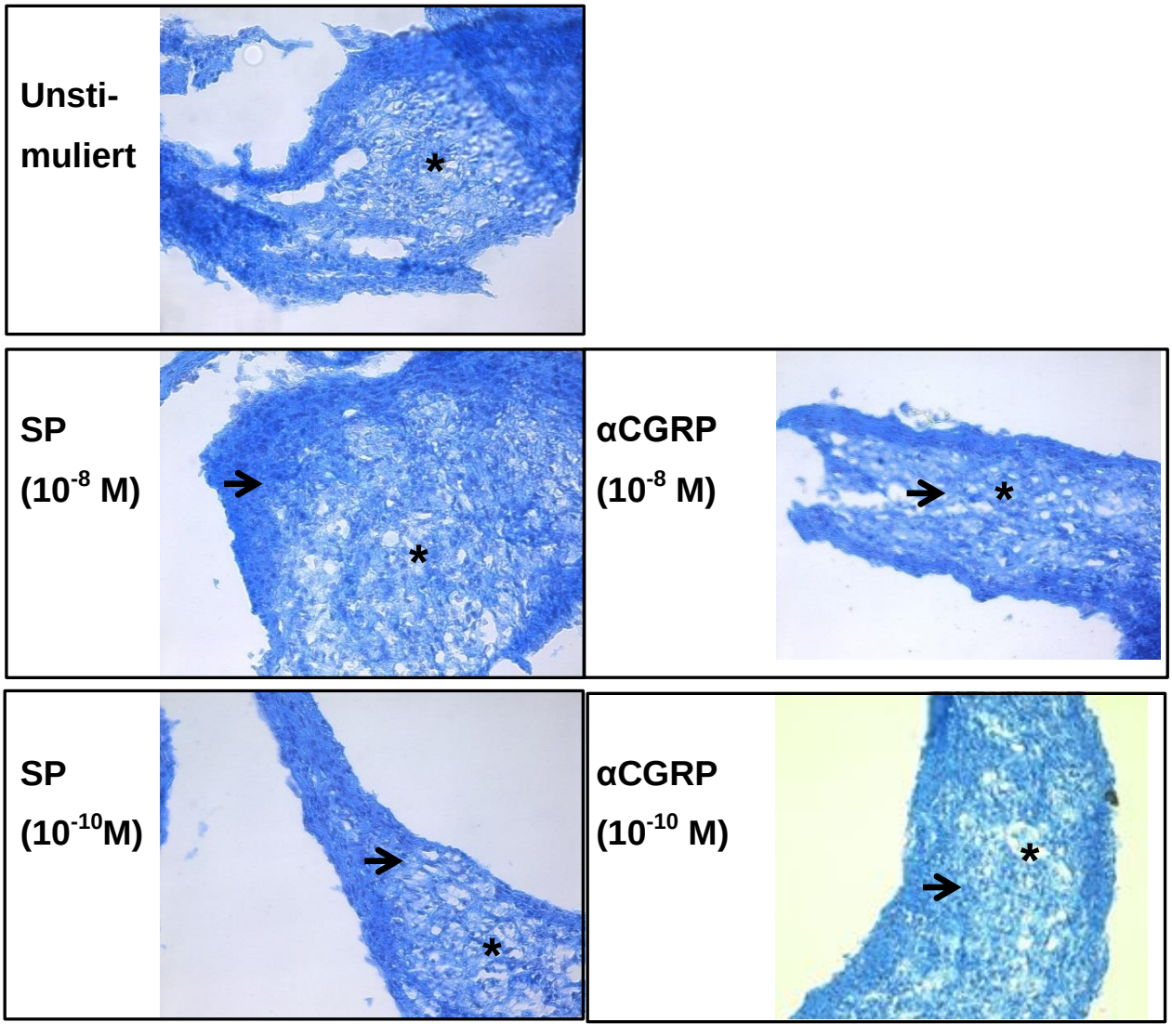


Abb. 30: Darstellung des GAG/DNA-Quotienten. Es zeigt sich an Tag 28 eine statistisch signifikante Verminderung des Gehaltes nach αCGRP Stimulation (10^{-8} M). $p<0,05$, n=6. Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.1.3 Einfluss von SP und αCGRP auf die EZM Struktur

Mit Hilfe von Alcianblau ist es möglich saure Proteoglykane der EZM anzufärben. Der histologische Nachweis und die mikroskopische Auswertung erfolgten an Tag 7, 14, 21 und 28 der chondrogenen Differenzierung. Dabei wurden die Intensität der Färbung, die Einzelzellmorphologie und der Abstand der Zellkerne zueinander mit in die Bewertung einbezogen. In unserer Arbeit zeigten die untersuchten hMSC eine hypertrophe Morphologie nach Tag 28 und eine deutliche, gleichmäßige Blaufärbung der EZM. Es konnte kein signifikanter Einfluss der beiden Neuropeptide SP und αCGRP auf die Intensität der Färbung (→), Einzelzellmorphologie oder Menge der gebildeten EZM im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden. Hier wird exemplarisch eine Färbung in 20-facher Vergrößerung an Tag 7 und an Tag 28 eines Chondrogeneseversuchs nach SP bzw. αCGRP Stimulation dargestellt. Insgesamt lässt sich feststellen, dass an Tag 28 im Vergleich zu Tag 7 mehr hypertrophe Zellstrukturen (*) in allen zu untersuchenden Gruppen gezählt werden konnten (Abb. 31).

Tag 7:



Tag 28:

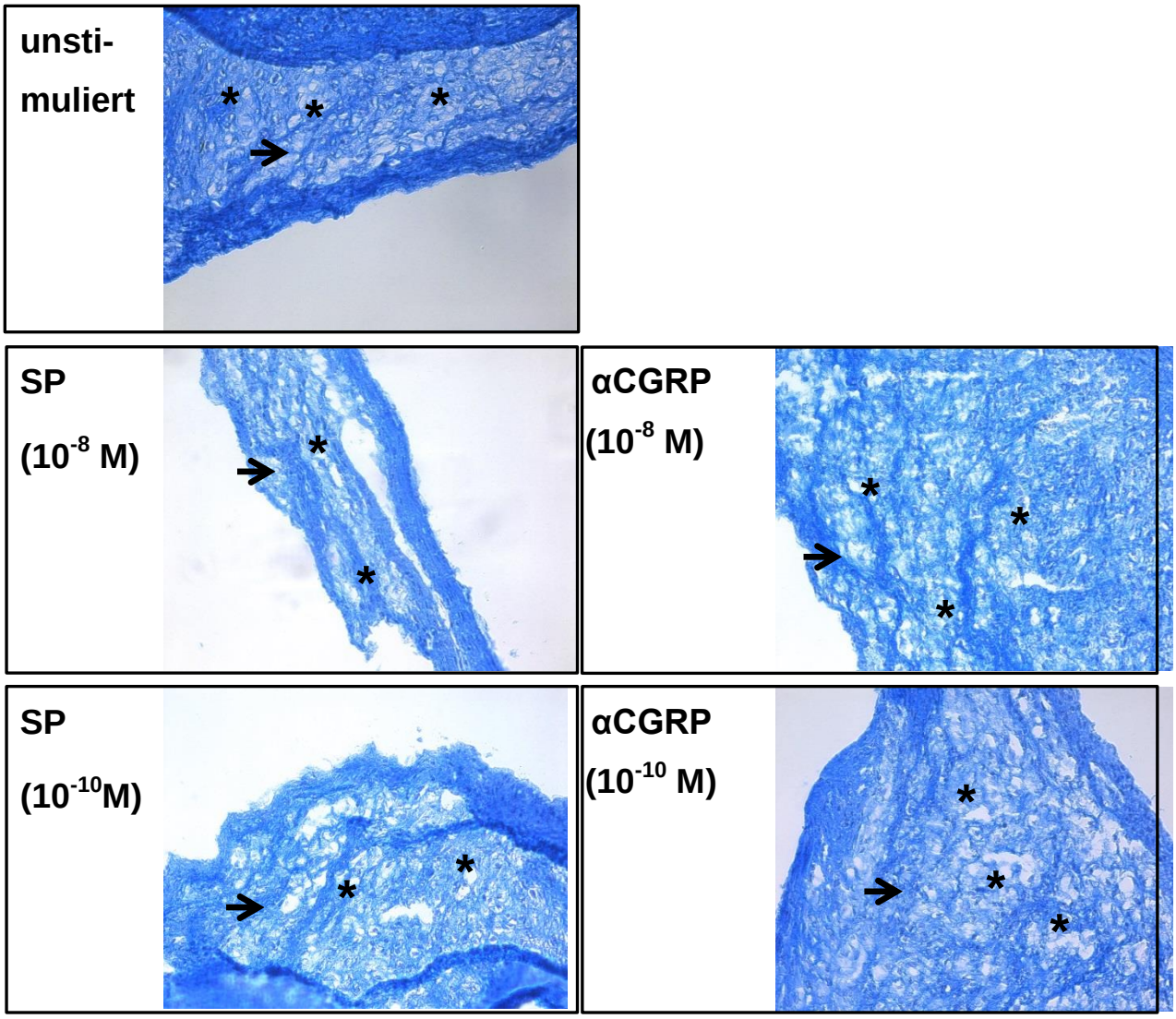


Abb. 31: Alcianblau-Färbung der Fibringele, Tag 7 und Tag 28 als Erntezeitpunkt in 20-facher Vergrößerung. Die hypertrophe Morphologie ist als (*) und die EZM als (→) dargestellt. An Tag 28 konnten im Vergleich zu Tag 7 mehr hypertrophe Zellstrukturen (*) in allen zu untersuchenden Gruppen gezählt werden.

4.1.4 Verminderter Kollagen II Gehalt nach Stimulation mit αCGRP

Da bereits die Genexpressionsdaten zeigten, dass nach αCGRP (10^{-8} M) Stimulation das COL2A1 mRNA-Level negativ beeinflusst wurde (Abb. 14), wurde der Kollagen II Gehalt aus dem Zelllysat für den DMMB-Assay mittels ELISA untersucht. Es wurden 7 Proben nach Stimulation mit αCGRP (10^{-8} M) an Tag 21 und 6 Proben nach Stimulation mit αCGRP (10^{-8} M) an Tag 28 untersucht. Dazu wurden noch einige ausgewählte Proben (n=5) nach Stimulation mit SP (10^{-8} M) getestet. Die Ergebnisse wurden mit der unstimulierten Probe als Referenz verglichen und in µg/ml angegeben. So zeigte sich an Tag 21 (Abb. 32A) nach αCGRP Stimulation (10^{-8} M) eine verminderte Produktion von Kollagen II. An Tag 28 ergab

sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 32B). Für SP (10^{-8} M) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

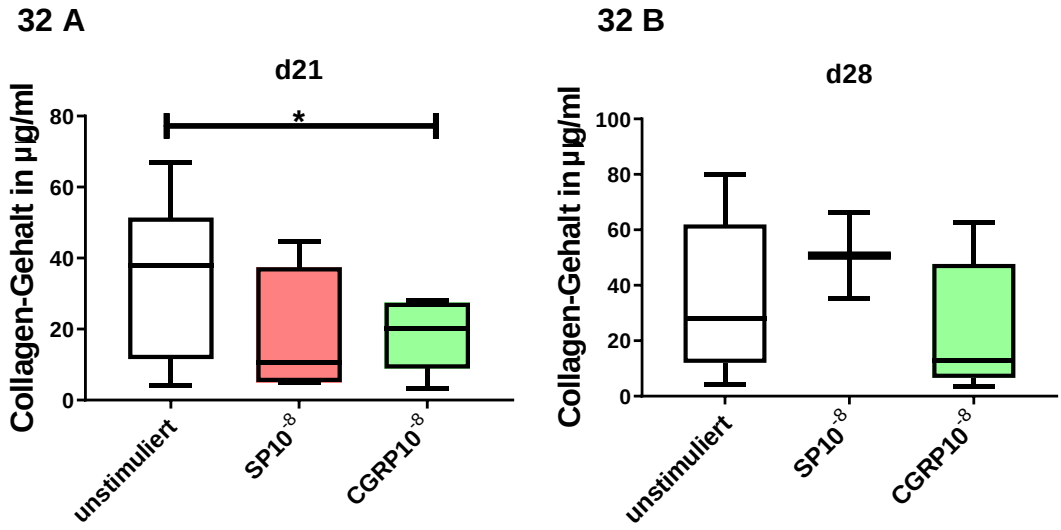


Abb. 32 A und B: Darstellung des **Kollagen II-Gehalts** in µg/ml aus dem Zelllysat eines halben Fibringels an Tag 21 und Tag 28.
A: An Tag 21 ließ sich ein verminderter Gehalt an Kollagen II nach Stimulation mit αCGRP (10^{-8} M) nachweisen. unstimuliert: n=7, SP10^{-8}: n=4, CGRP10^{-8}: n=7, Statistischer Test: Wilcoxon mixed paired signed rank test.
B: An Tag 28 konnte kein Einfluss der einzelnen Gruppen im Vergleich zur unstimulierten Gruppe auf den Kollagen II-Gehalt nachgewiesen werden. ($p<0,05$), unstimuliert: n=6, SP(10^{-8}): n=2, CGRP(10^{-8}): n=6 Statistischer Test: Wilcoxon mixed paired signed rank test.

4.1.5 IL1ß im Zellüberstand der Fibringele

Die Auswertung des IL1ß-ELISAs zeigte, dass die gemessenen Werte unter der ELISA-Nachweisgrenze von 3,91 pg/ml lagen.

4.2 Einfluss von SP und αCGRP auf undifferenzierte hMSC

Neben der Untersuchung des Einflusses von SP und αCGRP auf die chondrogene Differenzierung von hMSC in Fibringelen (3D-Zellkultur-System), sollten auch die Änderungen der Zellvitalität, der Proliferation, wie auch die Gen- und Protein-Expression ausgewählter Markergene in undifferenzierten hMSC untersucht werden. Dafür wurden die Zellen im Monolayer (2D-Kultur) kultiviert, mit SP bzw. αCGRP stimuliert und anschließend mit Hilfe verschiedener Methoden analysiert.

4.2.1 Änderung der Proteinexpression von Cyclin D1, Sox9 und Phospho-Sox9 unter SP bzw. αCGRP Stimulation

Für die Westernblot-Analysen wurden die Zellen nach einer zweitägigen Stimulation mit 10^{-8} M und 10^{-10} M SP bzw. 10^{-8} M und 10^{-10} M αCGRP geerntet und Proteinlysate hergestellt. Dabei sollte der Proteingehalt von Cyclin D1, Sox 9 und Phospho-Sox9 analysiert werden. ß-Actin diente als Ladekontrolle. Mit Hilfe von *Photoshop CS 5.1* konnte eine Grautonanalyse

durchgeführt werden, um die Ergebnisse des Westernblots zu quantifizieren. Exemplarisch werden hier Westernblots von zwei hMSC-Chargen gezeigt (Abb. 33).

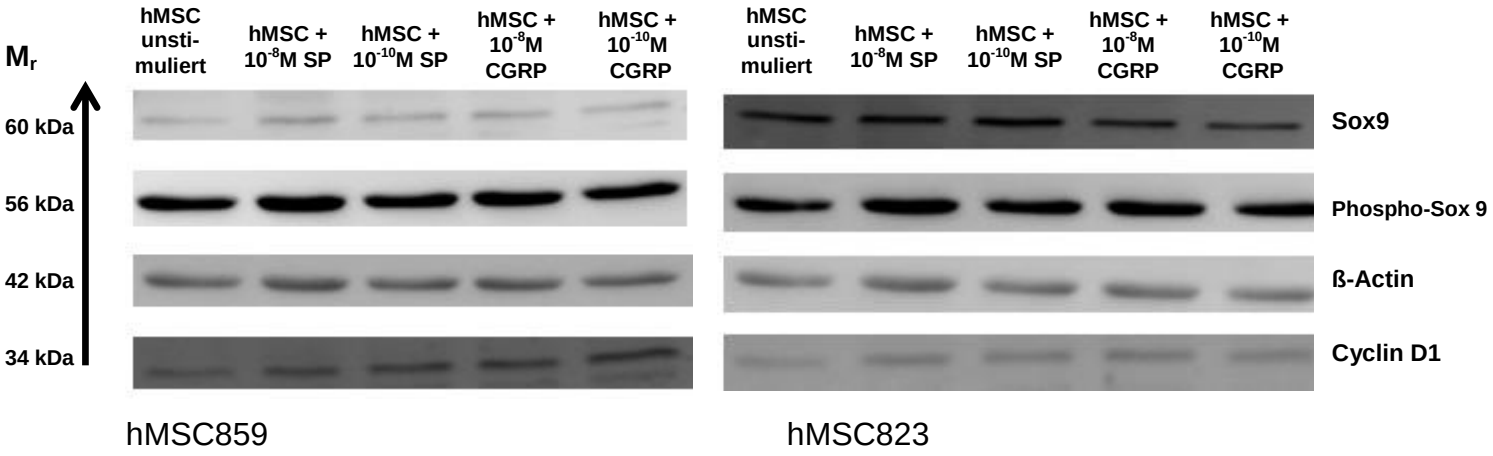


Abb. 33: Exemplarischer Westernblot von hMSC isoliert aus 2 verschiedenen Patienten. Untersucht wurde die Proteinexpression von Cyclin D1, Sox9 und Phospho-Sox9. Als interne Ladekontrolle wurde ß-Actin verwendet. Dargestellt werden die Proteine nach aufsteigender relativer Molekülmasse (M_r) in Dalton (Da) und nach Stimulation

Nach allen Stimulationen, außer αCGRP mit der Konzentration von 10^{-8} M, zeigte sich eine signifikant verstärkte Cyclin D1 Protein-Expression, wobei nach Stimulation mit 10^{-10} M αCGRP die größte Veränderung mit fast 50% mehr Proteingehalt verglichen zur unstimulierten Kontrolle auftrat (Abb. 34).

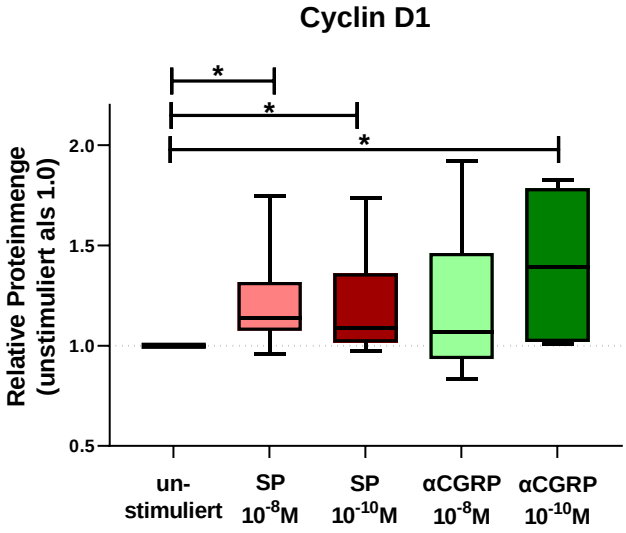


Abb. 34: Proteingehalt von **Cyclin D1** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Unter Stimulation von SP (10^{-8} M und 10^{-10} M) und αCGRP (10^{-10} M) zeigte sich eine vermehrte Proteinexpression. Eine unstimulierte Kontrolle dient als Kalibrator, $p<0,05$, $n=8$, Statistischer Test: unpaired t-test.

Obwohl sich in der Genexpression von SOX9 signifikante Reduktionen nach Neurotransmitter-Stimulation zeigten, konnte nach Quantifizierung der relativen Proteinmenge von Sox9 keine Änderung nachgewiesen werden (Abb. 35).

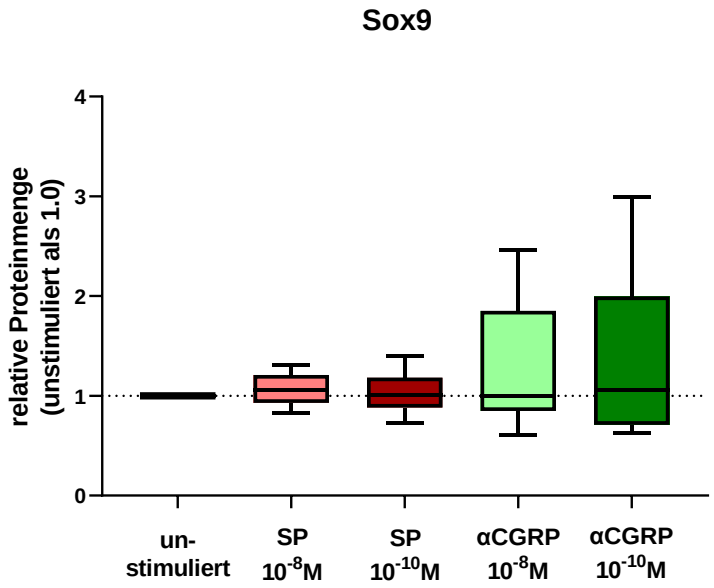


Abb. 35: Proteingehalt an **Sox9** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Unstimulierte Kontrollzellen dienen als Kalibrator, $p<0,05$, n=8, Statistischer Test: unpaired t-test.

Nach Stimulation mit αCGRP (10^{-10} M) reduzierte sich die Menge an Phospho-Sox9 und nach SP (10^{-8} M) Stimulation konnte vermehrt Phospho-Sox9 nachgewiesen werden (Abb. 36).

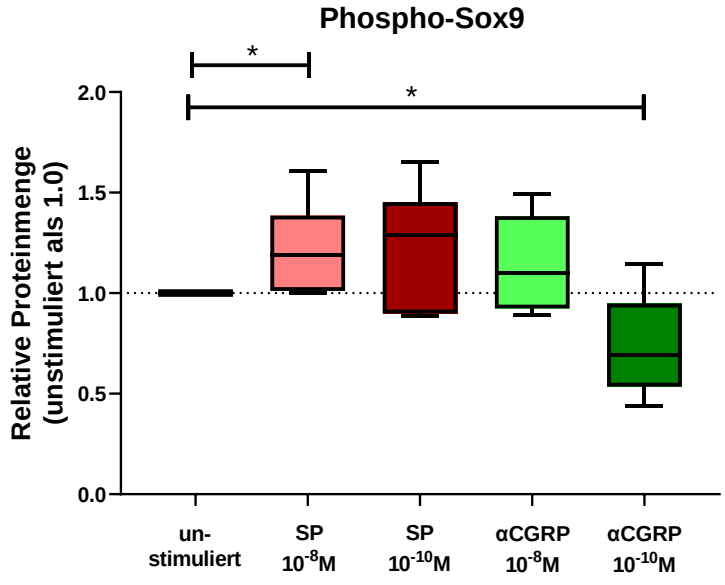


Abb. 36: Proteingehalt an **Phospho-Sox9** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Nach Stimulation mit SP (10^{-8} M) zeigte sich eine erhöhte Menge an phosphorylierten Sox9 und nach αCGRP (10^{-10} M) Stimulation fand sich eine reduzierte Menge an Phospho-SOX9. Unstimulierte Kontrollzellen dienten als Kalibrator, p<0,05, n=6, Statistischer Test: unpaired t-test.

Das Verhältnis von der phosphorylierten Form zur nicht-phosphorylierten Form von Sox9 zeigte nur unter der Stimulation mit αCGRP (10^{-10} M) eine signifikante Reduktion (Abb. 37).

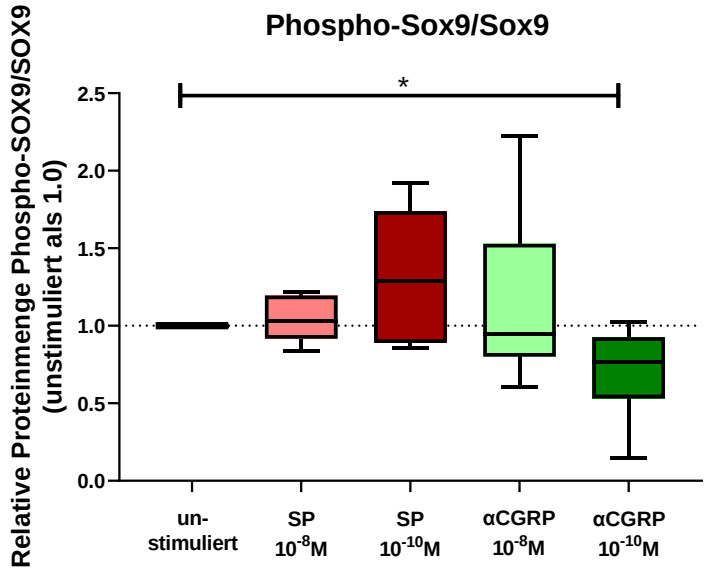


Abb. 37: **Phospho-SOX9** im Verhältnis zu **SOX9** unter zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Nach Stimulation von αCGRP (10^{-10} M) ergab sich ein vermindertes Verhältnis der Proteinmenge. Eine unstimulierte Kontrolle dient als Kalibrator, p<0,05, n=6, Statistischer Test: unpaired t-test.

4.2.2 Änderung der Zellzyklusverteilung nach Stimulation mit SP und αCGRP

Nach 24 Stunden Serumentzug zur Synchronisierung der Zellen und anschließend zweitägiger Stimulation mit den Neuropeptiden konnte mit Hilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen bestimmt werden, wie viele Zellen sich in den einzelnen Phasen des Zellzyklus befinden. Man kann dabei Zellen in G1-, S- und G2/M-Phasen unterscheiden. Beispielhaft wird eine unstimulierte Kontrolle und die Stimulation mit 10^{-10} M SP dargestellt. Insgesamt wurden hMSC von 7 verschiedenen Patienten analysiert.
Exemplarisch werden hier Histogramme von zwei Patienten gezeigt (Abb. 38 A und B). Unstimulierte Kontroll-Zellen zeigten folgende Verteilung im Zellzyklus: G1-Phase = 74,67% (+/- 8) S-Phase = 8,12% (+/- 1,05); G2-Phase = 18,68% (+/- 6) (Abb. 38A).
Nach der Stimulation mit 10^{-10} M SP ergaben sich folgende Werte: G1-Phase = 72,8%; S-Phase = 20,02%; G2-Phase = 7,28% (Abb. 38B).

Unstimulierte Kontrolle in Dean-Jett-Fox-Darstellung:

Anzahl der Zellen in den einzelnen Phasen

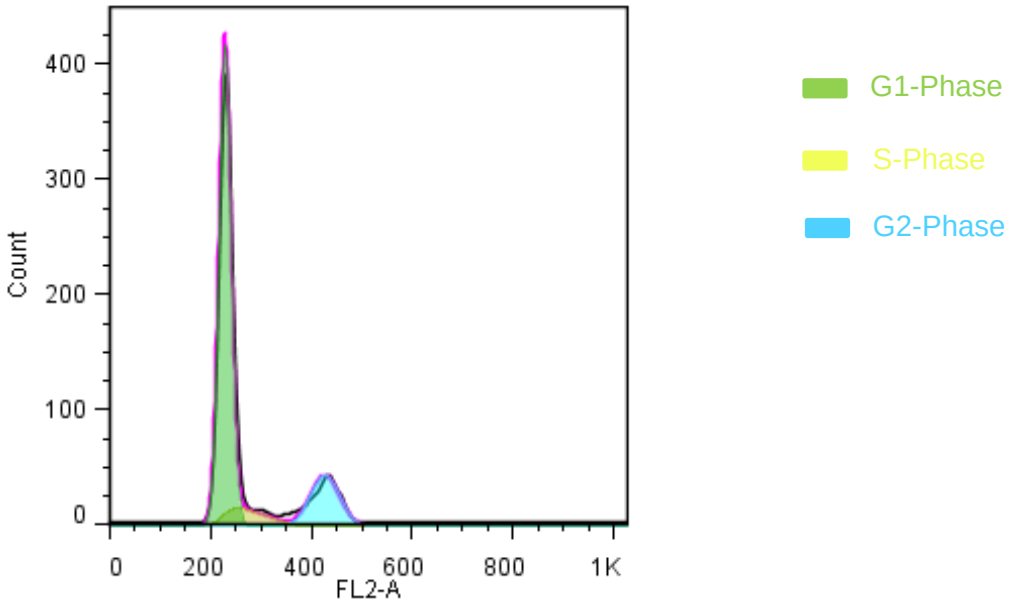


Abb. 38 A: Repräsentatives Histogramm einer durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse in Kontrollzellen (Dean-Jett-Fox-Darstellung).

10^{-10} M SP in Dean-Jett-Fox-Darstellung:

Anzahl der Zellen in den einzelnen Phasen

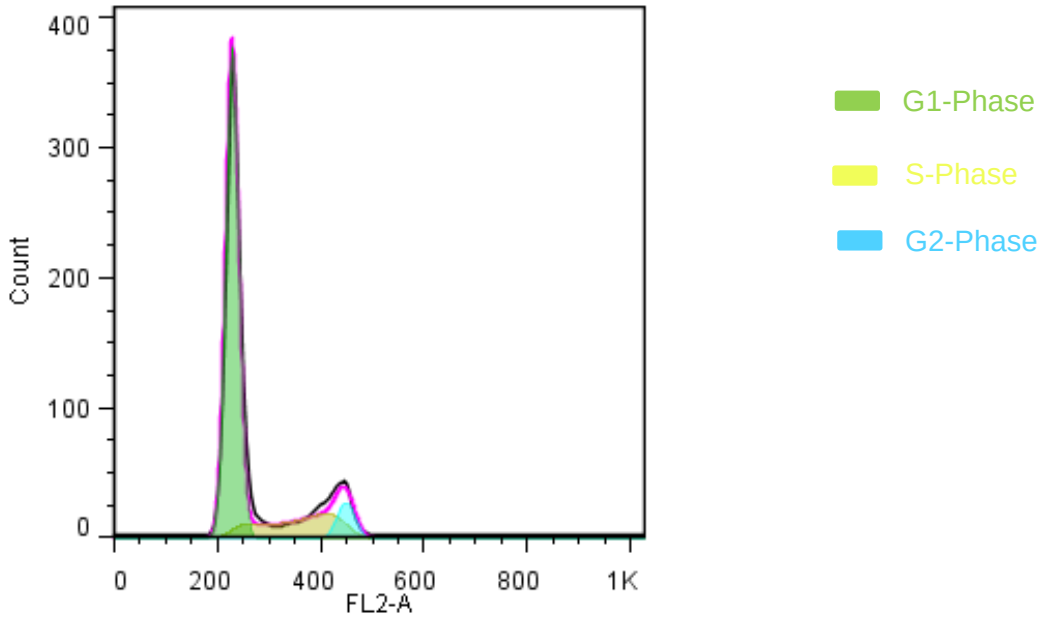


Abb. 38 B: Repräsentatives Histogramm einer durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse in Kontrollzellen (Dean-Jett-Fox-Darstellung).

In der vollständigen Auswertung der Diagramme zeigte sich zwischen den einzelnen Stimulierungen und der unstimulierten Kontrolle kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Menge der Zellen in der G1-Phase. Sowohl in den stimulierten Proben, als auch in der unstimulierten Kontrolle befanden sich jeweils ca. 70% der Zellen in der G1-Phase.

Es zeigte sich dagegen, dass die Zellen, die mit 10^{-10} M SP stimuliert wurden, einen höheren Anteil an S-Phase Zellen aufwiesen (7% für unstimulierte und 12% für die mit SP (10^{-10} M) stimulierten Zellen).

Für die G2-Phase konnten zwei statistisch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden: Zum einen der zu erwartende Effekt, dass Zellen, die mit SP (10^{-10} M) stimuliert wurden, einen geringeren Anteil an G2-Phase Zellen zeigten und zum anderen, dass Zellen, die mit αCGRP (10^{-10} M) behandelten wurden, eine verminderte Zellzahl in der G2-Phase aufwiesen (9% für unstimulierte und 5% für die mit SP (10^{-10} M) stimulierten Zellen, 6% αCGRP (10^{-10} M)) (Abb. 39).

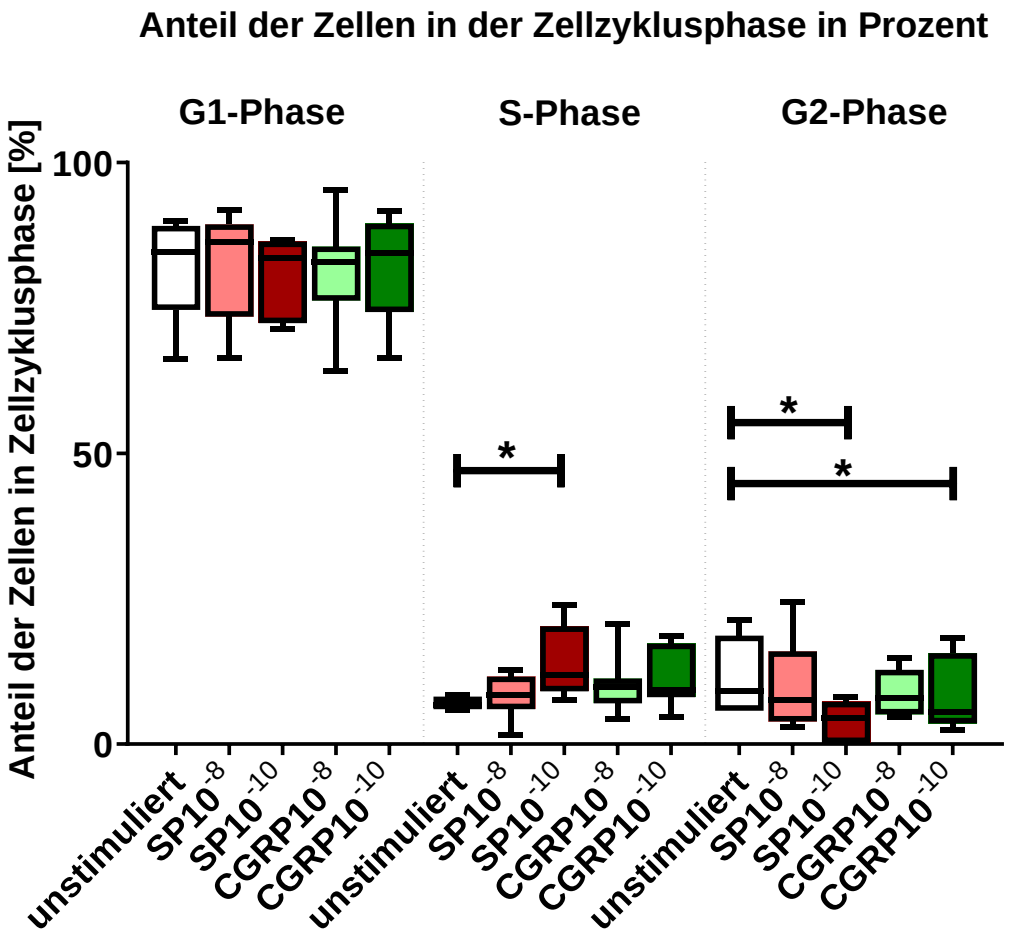


Abb. 39: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse wurden aufgetragen nach Zellzyklusphase und in Prozent. Nach Stimulation mit SP oder αCGRP ergaben sich keine Unterschiede bezüglich des Anteils der Zellen in der G1-Phase. Die Stimulierung mit SP (10^{-10} M) führte zu vermehrter Zellzahl in der S-Phase und weniger Zellen in der G2-Phase. Die αCGRP (10^{-10} M) Stimulierung führte ebenfalls zu einer verringerten Zellzahl in der G2-Phase. ($p< 0,05$, n=7), Statistischer Test: Wilcoxon mixed paired signed rank test.

4.2.3 Veränderte Genexpression in hMSC nach SP bzw. αCGRP Stimulierung in Monolayer-Kultur

In diesem Setting sollte die Veränderung verschiedener Gene in undifferenzierten hMSC nach zweitägiger Zugabe von SP bzw. αCGRP untersucht werden. Dabei wurden folgende ausgewählte Gene mittels qPCR auf mRNA-Ebene analysiert:

- Wachstumsfaktoren: FGF2, VEGFα (4.2.3.1)
- Adhäsionsmoleküle: ITGA10, ITGA11 (4.2.3.2)
- Chondrogene Marker: COL1A1, COL2A1, COL9A1, SOX9 (4.2.3.3)
- Katabole Marker: IL1β, IL8, TNFα (4.2.3.4)

4.2.3.1 Einfluss der Stimulation von SP auf die FGF2 und VEGFα Genexpression

Bei Analyse der Wachstumsfaktoren konnte keine Änderung der Genexpression von FGF2 nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 40).

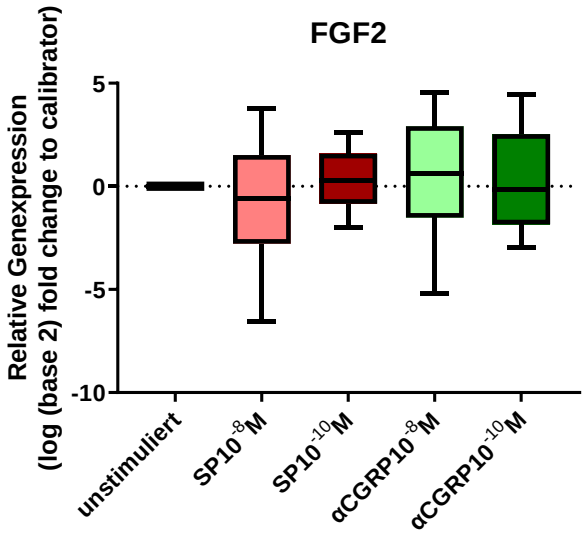


Abb. 40: Genexpressionsänderung von **FGF2** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Unstimulierte Kontrollzellen dienten als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=8, Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

VEGFα wurde im vorliegenden Versuch nach Stimulation mit 10^{-10} M SP von undifferenzierten Stammzellen verstärkt exprimiert (Abb. 41).

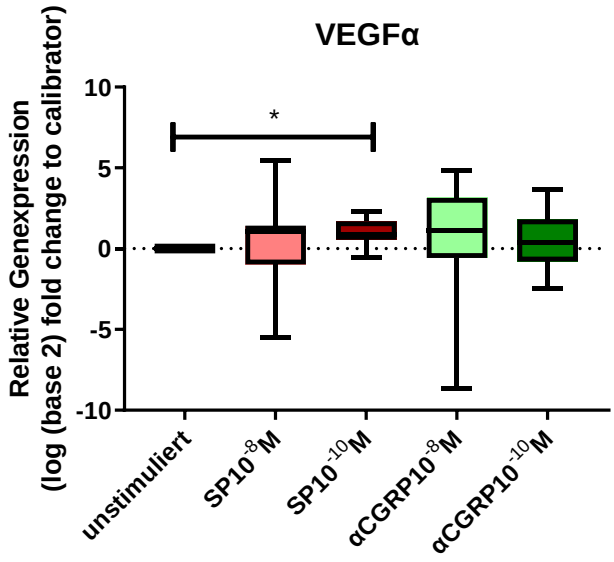


Abb. 41: Genexpressionsänderung von **VEGFα** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Nach Stimulation mit SP (10^{-10} M) zeigte sich eine verstärkte Genexpression. Unstimulierte Kontrollzellen dienten als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=8, Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.2.3.2 Einfluss der Stimulation von αCGRP auf die Zelladhäsion

Ein prominentes Zelladhäsionsmolekül auf der Chondrozytenoberfläche ist Integrin α10 (ITGA10), das primär im Prozess der chondrogenen Differenzierung gebildet wird. Nach zweitägiger Stimulation mit Neuropeptiden im Monolayer zeigten hMSC eine Halbierung der Expression dieses Gens durch den Einfluss der 10^{-10} M αCGRP Stimulation (Abb. 42A). Nach Stimulation mit SP und αCGRP ergaben sich keine signifikanten Unterschiede auf die Genexpression von ITGA11 in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle (Abb. 42B).

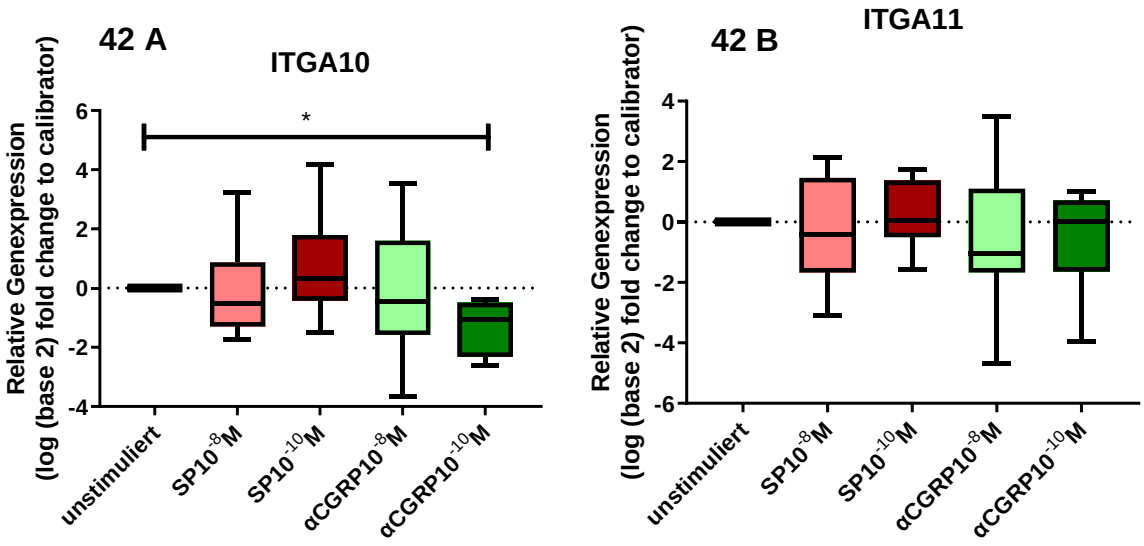


Abb. 42 A: Genexpressionsänderung von **ITGA10** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Nach Stimulation mit αCGRP (10^{-10} M) ergab sich reduzierte Genexpression von ITGA10.

Abb. 42 B: Genexpressionsänderung von **ITGA11** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Unstimulierte Kontrollzellen dienen als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=8, Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.2.3.3 SOX9 Genexpression in undifferenzierten hMSC

Die Expression ausgewählter chondrogener Marker konnte teilweise nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen werden. Daher konnten keine validen Aussagen zur Expression von COL2A1 und COL9A1 getroffen werden. Für die Genexpression von COL1A1 ergaben sich keine Unterschiede zwischen der unstimulierten Kontrolle und den stimulierten Gruppen (Abb. 43A).

Die Stimulation mit 10^{-10} M αCGRP hatte einen hemmenden Effekt auf die Genexpression von SOX9 in undifferenzierten Stammzellen (Abb. 43B).

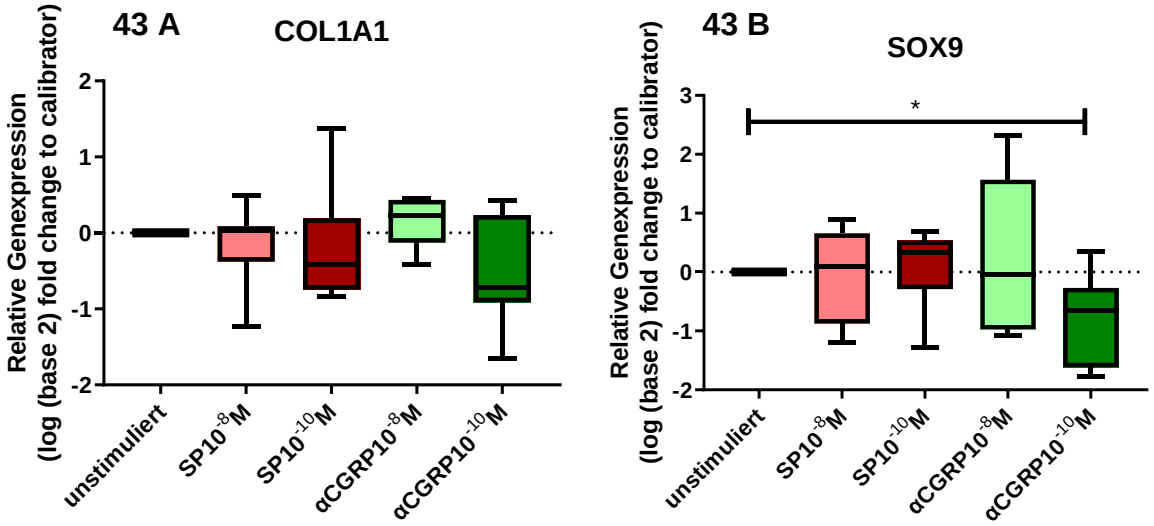


Abb. 43A: Genexpressionsänderung von **COL1A1** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Abb. 43B: Genexpressionsänderung von **SOX9** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Nach Stimulation mit αCGRP (10^{-10} M) zeigte sich eine verminderte Genexpression.

Unstimulierte Kontrollzellen dienen als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=8, Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

4.2.3.4 Genexpressionsänderung ausgewählter kataboler Zytokine

Nach Stimulation mit 10^{-8} M αCGRP zeigte sich im Rahmen dieses Versuchs, dass die Stammzellen vermehrt IL1β exprimierten (Abb. 44C). In anderen Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die unstimulierte Kontrolle. Sowohl bei TNFα als auch bei IL8 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den stimulierten Gruppen und der stimulierten Kontrolle (Abb. 44 A und B).

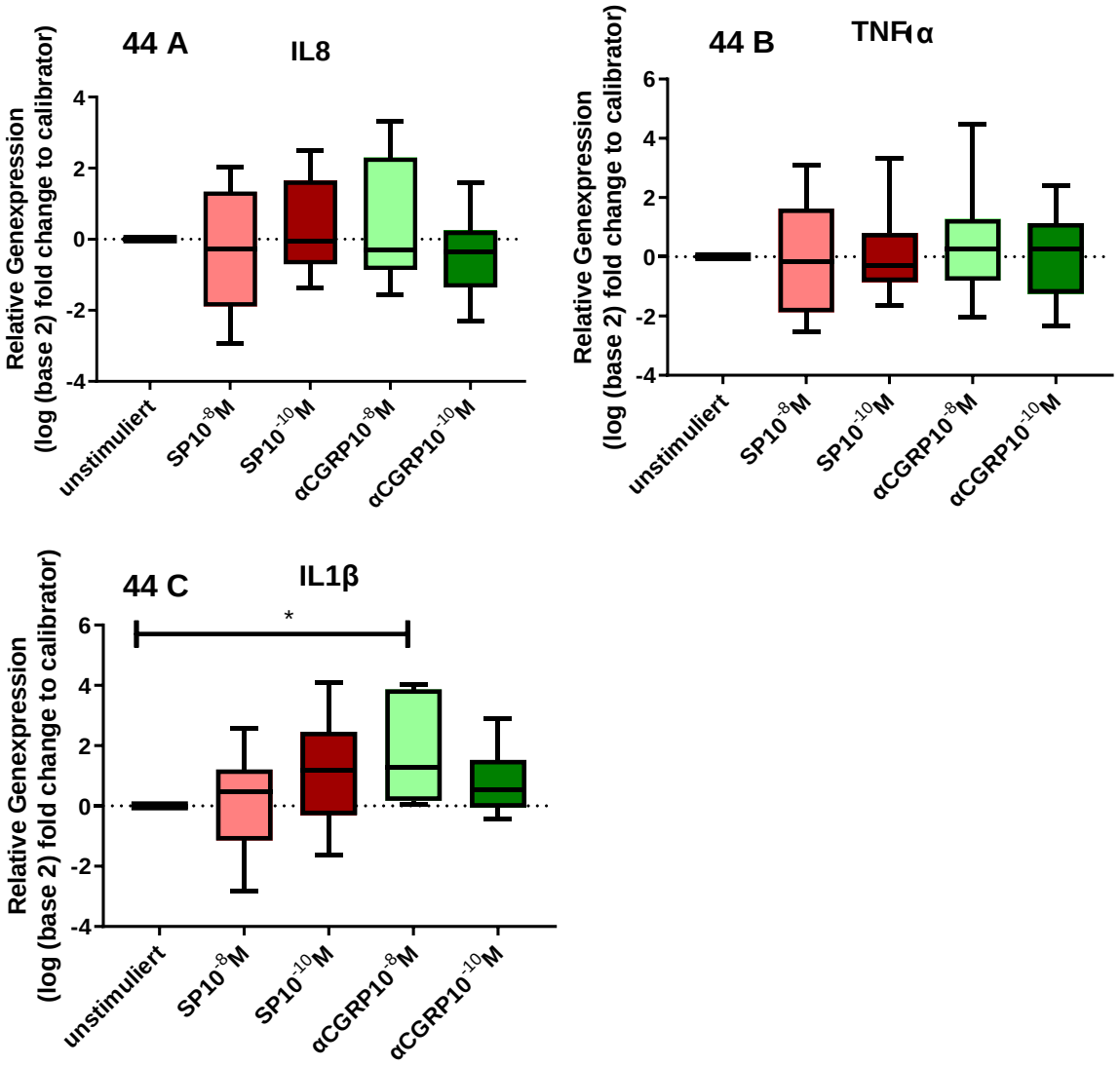


Abb. 44 A und B: Genexpressionsänderung von **IL8** und **TNFα** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.
Abb. 44 C: Genexpressionsänderung von **IL1β** nach zweitägiger Stimulation mit SP (10^{-8} M), SP (10^{-10} M), αCGRP (10^{-8} M) und αCGRP (10^{-10} M). Nach Stimulation mit αCGRP (10^{-10} M) zeigte sich eine erhöhte Genexpression.
Unstimulierte Kontrollzellen dienen als Kalibrator (0), $p<0,05$, n=8, Statistischer Test: Wilcoxon signed rank test.

5 Diskussion

5.1 Der Einfluss von SP auf die Expression kataboler Markergene und ihre Bedeutung in der Chondrogenese und Zellvitalität

Wir haben verschiedene ausgewählte katabole Zytokine während der chondrogenen Differenzierung (IL6, IL8 und TNFα) und in undifferenzierten Stammzellen (IL8, TNFα, IL1β) nach SP Stimulation untersucht.

In Bezug auf die Rolle von IL6 lassen unsere Daten vermuten, dass nach SP Stimulation IL6 einen verstärkten hemmenden Einfluss auf das Differenzierungspotential, in Abhängigkeit von Dosis und Stimulationsdauer, von hMSC haben könnte. So produzierten in der zeitlichen Verlaufsdarstellung unserer Ergebnisse die unstimulierten Kontrollzellen während des Chondrogeneseprozesses an Tag 21 verglichen mit Tag 7 vermindert IL6. Die Autoren Pricola *et al.* verglichen in ihrer Versuchsreihe die Genexpression von IL6 von undifferenzierten hMSC mit der Genexpression von IL6 von chondrogen, adipogen oder osteogen differenzierten hMSC nach Tag 7 bzw. Tag 14. Hierbei konnten sie ebenso eine verminderte Genexpression von IL6 in den differenzierenden hMSC nachweisen. Die Autoren schlossen daraus, dass unstimulierte hMSC durch vermehrte IL6 Produktion vor Differenzierung bewahrt bzw. in ihrer Differenzierungseigenschaft beeinträchtigt werden und identifizierten den ERK 1/2 Signalweg als einen Schlüsselfaktor dieser Effekte (Pricola et al. 2009).

Eine Stimulation mit SP bewirkte in unserer Arbeit während des gesamten Prozesses der chondrogenen Differenzierung ein stabiles Niveau der IL6 Genexpression und die Stimulation mit einer hohen Konzentration von SP (10^{-8} M) ergab zusätzlich für IL6 an Tag 28 einen signifikanten Anstieg der Genexpression. Dies könnte darauf hinweisen, dass nach SP Stimulation die Expression dieses proinflammatorischen Interleukins auf einem hohen Niveau gehalten wird und so die hMSC vor einer Differenzierung schützen könnte.

Konträr zu diesen Ergebnissen fanden die Autoren Kondo *et al.* im Jahr 2015 heraus, dass IL6 über den STAT3–Signalweg einen positiven Einfluss auf die chondrogene Differenzierung von hMSC ausübt. Nach Stimulation mit IL6 konnte vermehrt Kollagen II, Aggrecan und Kollagen X gefunden werden (Kondo et al. 2015). Möglicherweise wird dieser positive Einfluss von IL6 auf die chondrogene Differenzierung nach Stimulation mit SP verstärkt, was die erhöhte Genexpression von COL10A1 und COL2A1 nach SP-Stimulation in der vorliegenden Arbeit erklären würde.

Ein IL6-Genexpressionsmaximum war bei den Untersuchungen von Kondo *et al.* an Tag 7 nachweisbar (Kondo et al. 2015). Verglichen mit unseren Daten zeigte sich während des gesamten Prozesses ein stabiles Niveau der IL6 Genexpression und nur die hohe Konzentration von SP resultierte in einem signifikanten Anstieg der Genexpression von IL6

an Tag 28. Eine Stimulation mit SP in der hohen Dosis könnte also möglicherweise dazu beitragen, dass IL6 nicht nur zu Beginn der chondrogenen Differenzierung gebildet wird, sondern über 28 Tage hinweg die chondrogene Differenzierung der hMSC fördert.

Um genauer Aufschluss erhalten zu können, inwiefern IL6 als Effektormolekül auf die hMSC selbst wirkt, sollte während der 28 Tage die Menge an IL6 im Zellkulturmedium analysiert werden, z.B. mittels ELISA.

Wie sich in der Genexpressionsanalyse gezeigt hat, wird das pro-inflammatorische Zytokin IL8 nach 10^{-8} M SP Stimulation in den ersten 7 Tagen am höchsten exprimiert und nimmt anschließend im Laufe der Chondrogenese ab. Wie die Arbeitsgruppe um Borzi *et al.* herausfanden, produzierten Chondrozyten im OA Knorpel vermehrt IL8 und *growth-related oncogene alpha* (GROα)/CXCL1 (Borzi et al. 1999). Wurden Chondrozyten mit IL8 oder (GROα)/CXCL1 stimuliert, neigten sie zur verstärkten Hypertrophie (Merz et al. 2003). Sie exprimierten nach IL8-Stimulation vermehrt MMP-13 und Kollagen X und zeigten eine verstärkte Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

In unserem Projekt konnte ebenfalls bereits nach 7 Tagen eine vermehrte Genexpression von COL10A1 nachgewiesen werden, was sich mit den Daten von Borzi *et al.* deckt. Allerdings haben wir in unserer Alcianblau Färbung keine signifikanten makroskopischen Hinweise gefunden, dass sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe vermehrt hypertrophe Zellen gebildet hätten (Borzi et al. 1999) (siehe Punkt 4.1.3.)

Nach Implantation von IL8 und Knochemarkskonzentrat-haltigen Matrizes in iatrogen induzierten, osteochondralen Defekten von Hundeknien konnte mittels Immunhistochemie eine vermehrte Bildung von Kollagen II und Aggrecan im regenerierten Gewebe der früheren Defektzone nachgewiesen werden. IL8 wurde dabei in Kombination mit einem Knochemarkskonzentrat verwendet, weshalb eine direkte Zuordnung des Effektes erschwert wird (Yoon et al. 2016).

Deshalb sollten diese Beobachtungen auf Proteinebene (z.B. Westernblot und SDS-PAGE) überprüft werden, um weitere Aussagen über die Rolle von IL8 während der chondrogenen Differenzierung von hMSC treffen zu können.

Hong und Son führten verschiedene Experimente durch, um die inflammatorischen Prozesse im Verlauf der rheumatoiden Arthritis genauer zu analysieren. Dabei untersuchten sie unterschiedliche inflammatorische Marker, darunter auch TNFα. TNFα induziert pro-inflammatorische Prozesse und steigert auch die Apoptoserate verschiedener Zellen, z.B. von Chondrozyten (Aizawa et al. 2001) oder von hMSC (Li et al. 2019). Im Vergleich zu unseren Daten, exprimierten die hMSC in der späten Phase der Chondrogenese vermindert TNFα. Auch konnte im Verlauf der Chondrogenese eine Reduktion des TNFα-Niveaus an Tag 14 festgestellt werden. Diese Effekte konnten lediglich nach Stimulation der hMSC mit

10^{-8} M SP nachgewiesen werden, was auf eine konzentrationsabhängige Rolle des Neuropeptids hindeutet.

Die Stimulation mit SP und seinem zugehörigen NK1-Rezeptor bewirkte auch in Tenozyten eine verminderte Produktion von TNFα und ebenso eine verminderte Apoptoserate (Backman et al. 2014). Auch in unserem Versuchsaufbau könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen reduzierter TNFα Bildung und damit reduzierter Apoptose von hMSC bzw. Chondrozyten bestehen. Die Rolle von SP auf die Zellvitalität wird noch in 5.2 genauer dargestellt.

Des weiteren konnte für TNFα nachgewiesen werden, dass es auch die Chondrozyten in ihrer Funktion hemmen kann. Die Autoren Reginato *et al.* konnten nachweisen, dass mit TNFα oder in Kombination mit Interferon γ stimulierte Chondrozyten die Genexpression von COL2A1 in vitro supprimieren kann (Reginato et al. 1993). So könnte also nach Stimulation mit SP und in Konsequenz davon reduzierter TNFα Genexpression die chondrogenen Prozesse positiv beeinflusst werden. Allerdings wählten die Autoren Reginato *et al.* im Vergleich zur vorliegenden Arbeit unterschiedliche Stimulationszeiträume. Sie stimulierten die Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden, was einen Vergleich mit unseren Ergebnissen erschwert. Zudem wählten sie für die Stimulation differenzierte Chondrozyten, während wir undifferenzierte Vorläuferzellen verwendeten. Dies lässt weiterhin vermuten, dass SP das Zellüberleben und den Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus und der Stimulationsdauer beeinflusst.

Zusammenfassend trägt eine Stimulation mit SP in der hohen Konzentration (10^{-8} M) dazu bei, dass IL6 nicht nur zu Beginn der chondrogenen Differenzierung gebildet wird, sondern über 28 Tage hinweg die chondrogene Differenzierung der hMSC fördern könnte und zudem mittels IL8 eine hypertrophe Wirkung ausüben könnte, da es in den ersten 8 Tagen proportional eine vermehrte COL10A1 Genexpression induzierte.

Die Zellvitalität könnte über eine reduzierte Apoptoserate aufgrund einer reduzierter TNFα Bildung nach SP Stimulation beeinflusst werden. Allerdings sollte zur Komplettierung unserer Ergebnisse die Rolle des STAT3- und ERK1/2-Signalwege genauer untersucht werden.

5.2 Konzentrationsabhängiger Einfluss von SP auf Proliferation und Zellvitalität von hMSC

Proliferation:

Der Einfluss von SP auf die Proliferation ist abhängig vom Zelltyp, der Stimulationsdauer und der Konzentration von SP.

In dieser Arbeit untersuchten wir den Zellzyklus und in diesem Zusammenhang Cyclin D1.

Nach SP-Stimulation in beiden Konzentrationen ließ sich eine erhöhte Proteinexpression von Cyclin D1 feststellen. Mit 10^{-8} M SP Stimulation konnten Fu *et al.* einen signifikanten Anstieg

der Genexpression von Cyclin D1 an Tag 4 und Tag 7 nachweisen (Fu et al. 2014). Die Autoren Dubon *et al.* untersuchten die Proteinmenge von Cyclin D1 in OP9 Zellen, einer Zelllinie, die von murinen MSC abstammt (Gao et al. 2010). Auch sie konnten eine vermehrte Cyclin D1- Proteinbiosynthese nachweisen (Dubon und Park 2015). Die Autoren schlossen daraus, dass die Stimulation mit SP eine proliferationsfördernde Wirkung auf MSC hat.
So konnten mehrere Autoren, darunter Niedermair *et al.*, einen proliferationsfördernden Effekt in der frühen Phase der osteogenen Differenzierung von hMSC nachweisen (Niedermair et al. 2018). Kostale Chondrozyten steigern ebenfalls ihre Proliferationsaktivität nach SP-Stimulation, wobei ein Maximum an Tag 7 festgestellt werden konnte (Opolka et al. 2012). Bei längerer Stimulationsdauer wurde sowohl bei osteogen differenzierenden hMSC als auch in Chondrozyten ein negativer Effekt auf die Proliferation festgestellt (Opolka et al. 2012; Niedermair et al. 2018). In dieser Arbeit wurden keine Daten bezüglich Änderung der Cyclin D1 Proteinmenge und somit Einfluss auf die Proliferation nach Langzeit-Stimulation (Tag 21, Tag 28) erhoben.
Um genauer Aufschluss zu erhalten, was auf Zellzyklusebene passiert, analysierten wir die einzelnen Phasen. Eine Verteilung zugunsten der S-Phase aufgrund der vermehrten Cyclin D1-Expression wäre zu erwarten gewesen. In unseren durchflusszytometrischen Analysen hatte eine Stimulation mit einer hohen Konzentration von SP (10^{-8} M) keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Allerdings konnten wir zeigen, dass hMSC, stimuliert mit 10^{-10} M SP, vermehrt in der S-Phase bleiben. Korrespondierend dazu ergab sich eine Zellzahlverminderung in der G2/Mitose-Phase. Dies spricht dafür, dass SP in einer Konzentration von 10^{-10} M, wahrscheinlich vermittelt durch Cyclin D1, zwar den Übertritt in die S-Phase förderte, aber die Prozesse in der S-Phase verlangsamte, also unter anderem die DNA-Replikation. In Glioblastomzellen, stimuliert mit radioaktiv modifiziertem SP, konnte ebenso ein vermehrter Anteil von Zellen in der S-Phase verzeichnet werden (Majkowska-Pilip et al. 2018). Die Autoren schlossen daraus, dass SP dadurch die Proliferation der Krebszellen hemmt, was auf unsere Ergebnisse übertragen werden könnte.
Eine verlängerte S-Phase könnte auch die Zellen vor weiteren differenzierenden Einflüssen schützen, indem es die Dauer der G1-Phase reduziert. Die DNA würde hierbei in der S-Phase als offene Euchromatinstruktur vorliegen, wie es für pluripotente Zellen typisch ist (Herrera et al. 1996).
Eine ähnliche Wirkung könnte eine 10^{-10} M SP Stimulation auch auf die hMSC in unserem Versuchsaufbau haben.
So hat SP in hoher Konzentration eine mögliche proliferationsfördernde Wirkung auf hMSC, während SP in niedriger Konzentration die S-Phasendauer verlängert und so eine hemmende Wirkung auf die Proliferation haben könnte.

Eine genauere Untersuchung einer möglichen Wirkung der SP-Stimulationen auf die Proliferation der hMSC erfordert allerdings die Überprüfung der in der S-Phase und anderer am Zellzyklus beteiligter Cycline und Cyclin-abhängiger-Kinasen und die Durchführung von Proliferationsassays (z.B. BrdU-Assay).

Apoptose:

Im Hinblick auf die Apoptose wurde im vorliegenden Projekt die Genexpression von BCL2 analysiert. BCL2 kann durch Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials die Apoptose hemmen und wird von Initiator-Caspasen deaktiviert (Kowaltowski et al. 2002). In unserer Arbeit wirkte eine Stimulation mit SP konzentrationsabhängig sowohl fördernd als auch hemmend auf die BCL2-Genexpression der hMSC je nach Differenzierungsstadium. So exprimierten hMSC während ihrer chondrogenen Differenzierung an Tag 21 nach Stimulation mit beiden SP Konzentrationen BCL2 verstärkt, jedoch an Tag 28 durch 10^{-10} M SP Stimulation vermindert. Man kann also vermuten, dass SP in der frühen Phase der Differenzierung positiv auf die Zellviabilität wirkt, während die niedrige Konzentration in der späten Differenzierungsphase die Apoptose der hMSC fördert.

Auf undifferenzierte hMSC wird in der Literatur vor allem ein anti-apoptotischer Einfluss von SP angenommen. Nach SP-Stimulation von murinen MSC konnte eine verlängerte Aktivierungsphase des Erk1/2-Signalweges und eine gesteigerte BCL2 Expression nachgewiesen werden. Die Wirkung verschiedener ausgewählter pro-apoptotischer Moleküle, wie Caspase-3 und Bax, zeigte sich abgeschwächt (An *et al.* 2011). Datta *et al.* konnten des weiteren nachweisen, dass eine Stimulation mit SP sowohl Bad (Datta *et al.* 1997), als auch die Produktion verschiedener Caspasen inhibieren konnte und somit einen anti-apoptotischen Effekt unterstützte (Cardone *et al.* 1998). Bad steht für „BCL2 antagonist of cell death“ und fördert die Apoptose, indem es an BCL2 bindet (Tan *et al.* 2000). Die Autoren Fu *et al.* untersuchten die Wirkung von SP auf die Apoptose, indem sie hMSC für 24 Stunden Serum-frei kultivierten und währenddessen kontinuierlich mit SP stimulierten. Sie beobachteten eine Reduktion der Caspase 3- und Caspase 9-Aktivität und des Bax-/BCL2 – Verhältnisses und schlossen daraus, dass die Apoptoseaktivität der hMSC inhibiert wurde. Durch Blockade des Wnt-Signalweges war die Wirkung der SP-Stimulation nicht mehr reproduzierbar (Fu et al. 2015). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe lassen somit auf einen inhibitorischen Effekt von SP auf eine durch Serum-Entzug induzierte Apoptose der MSC schließen, die über den Wnt-Signalweg vermittelt wird. In Bezug auf unser Projekt besteht ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Differenzierung und dem Einfluss auf BCL2-Genexpressionsänderung durch SP-Stimulation. Allerdings sollten, um eine weitere Aussage über den möglichen Einfluss auf die Apoptoseprozesse treffen zu können, weitere Marker

der Apoptose und auch die Rolle des Wnt-Signalweges im Verlauf der chondrogenen Differenzierung untersucht werden.

5.3 Konzentrationsabhängiger Einfluss der SP-Stimulation auf die chondrogene Differenzierung von hMSC

Neben Kollagen II und dem GAG- Gehalt wurde auch der für die Chondrogenese maßgebliche Transkriptionsfaktor SOX9 untersucht. Nach 10^{-10} M SP Stimulation der hMSC wurde eine verminderte Genexpression von SOX9 an Tag 21 und 28 festgestellt.

Verschiedene Autoren beschrieben ein Verschwinden der Expression von SOX9 im Verlauf der Chondrogenese, sobald der Hypertrophieprozess einsetzt (Goldring et al. 2006a), (Akiyama 2011). In Bezug auf unsere Ergebnisse lässt dies zwei mögliche Schlüsse zu: Entweder SP verzögert den Prozess der Differenzierung und ein entsprechender Anstieg der SOX9 Expression setzt erst zu einem späteren Zeitpunkt ein, oder SP beschleunigt den Übergang zur hypertrophen Phase.

Um diese Frage beantworten zu können, haben wir den Hypertrophiemarker Kollagen X analysiert. Die Genexpression von COL10A1 war bereits nach Tag 7 bei beiden SP Konzentrationen verstärkt nachweisbar. Die Autoren Solchaga *et al.* erstellten ein Versuchsprotokoll für die chondrogene Differenzierung von hMSC (Solchaga *et al.* 2011). Dabei konnten sie spätestens an Tag 14 für hMSC in der Zellkultur chondrogene Markergene nachweisen. Geht man davon aus, dass dies unseren unstimulierten Kontrollen entspricht, so könnte man annehmen, dass SP in der frühen Phase der Chondrogenese den Übergang der Zellen in einen hypertrophen Zustand begünstigt. In der Verlaufsdarstellung zeigte sich unter der Stimulation zwar erst ein verspäteter Anstieg der Genexpression von COL10A1 ab Tag 21, allerdings diente in dieser Darstellung Tag 7 als Kalibrator, weshalb sich keine Rückschlüsse auf den absoluten Anstieg schließen lassen und somit den verspäteten Anstieg von COL10A1 erklären könnte.

Interessanterweise ließ sich SP im mesenchymalen und knorpeligen Kallusgewebe, allerdings nicht im hypertrophen Kallusgewebe nachweisen (Niedermair et al. 2014) Es konnte jedoch gezeigt werden, dass hypertrophe Chondrozyten im Fraktur-Kallus den NK1-R exprimierten und so durch SP-Stimuli aktiviert werden könnten. Dies lässt vermuten, dass SP je nach physiologischen oder pathologischen Bedingungen eine unterschiedliche Rolle einnimmt.

Des Weiteren untersuchten wir undifferenzierte hMSC unter dem Einfluss der SP Stimulation auf die Genexpression hypertropher Marker, wie Kollagen X (wie bereits diskutiert) und VEGFα. Wir konnten eine verstärkte VEGFα-Genexpression in 10^{-10} M SP stimulierten hMSC beobachten, was auf eine Hypertrophie-fördernde Wirkung von SP hindeutet. Denn nicht nur Kollagen X (Arnold et al. 2007) ist an dem Prozess der Zellhypertrophie beteiligt, sondern

auch MMPs und VEGFα. VEGFα ist der Hauptregulator der Angiogenese während des Knochenwachstums und reguliert vor allem die Ossifikation des Wachstumsfugenknorpels und wird zu Beginn der enchondralen Ossifikation von hypertrophen Chondrozyten produziert. VEGFa wird nicht von proliferierenden Chondrozyten gebildet (Nagao et al. 2017). So untersuchten einige Autoren den Einfluss einer Inhibition von VEGFα auf die Chondrogenese. Sie konnten feststellen, dass durch eine Blockade des VEGF-Rezeptors oder durch Zugabe eines VEGFα-Antagonisten die Chondrogenese von Stammzellen stimuliert wurden (Marsano et al. 2016; Kubo et al. 2009). In Bezug auf unsere undifferenzierten hMSC könnte vermutet werden, dass sie in ihrer Eigenschaft, chondrogen zu differenzieren, gehemmt werden. Nichtsdestotrotz müsste die Regulierung der VEGFα-Genexpression während dem Prozess der chondrogenen Differenzierung und auch auf Proteinebene untersucht werden, um unsere Daten zu komplettieren.

Zudem zeigten unsere Versuche nach Stimulation mit 10^{-10} M SP eine reduzierte Genexpression des mesenchymalen Stammzellmarkers COL3A1, was eine Induktion der Chondrogenese der hMSC bestätigen würde.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse, förderte eine Stimulation mit 10^{-10} M SP möglicherweise den Übergang der Zellen in einen hypertrophen Zustand. Allerdings konnten wir bezüglich der Kollagen-II-und der GAG-Produktion oder der Proteoglykanfärbung unserer Zellaggregate keine signifikanten Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle finden.

Nach Stimulierung der hMSC mit 10^{-8} M SP konnte für die COL2A1 Genexpression ein später Anstieg im Verlauf der chondrogenen Differenzierung festgestellt werden. Auch einer der mesenchymalen Stammzellmarker, COL1A1, war an Tag 21 noch nachzuweisen, was eine inhibierende Wirkung von SP (10^{-8} M) auf die Chondrogenese unterstützt. Des Weiteren zeigte sich ein Abfall der FGF2 Genexpression an Tag 14 unter 10^{-8} M SP Stimulation. FGF2 ist eines der wichtigsten Mitogene für Chondrozyten sowohl im Knorpel, als auch in der Wachstumsfuge (Hill et al. 1992; Coffin et al. 1995; Loeser et al. 2005). Dazu steht in scheinbarem Widerspruch, dass nach Stimulation mit SP vermehrt Zellen in der S-Phase nachgewiesen werden konnten. Allerdings konnte keine Aussage bezüglich der Proteinmenge von FGF2 getroffen werden, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Des weiteren befanden sich nur Zellen nach Stimulation mit der geringeren SP Konzentration gehäuft in der S-Phase, was erneut einen konzentrationsabhängigen Mechanismus wahrscheinlich macht.

FGF2 hat allerdings noch eine wichtige Rolle in der Suppression von COL10A1 und schützt so die Zellen präventiv vor Hypertrophie im Verlauf der enchondralen Ossifikation (Weiss et al. 2010). Möglicherweise könnte die verstärkte Genexpression von COL10A1 durch eine verringerte FGF2 Genexpression bedingt werden. Allerdings konnten wir nur Änderungen in der Genexpression nach SP-Stimulation nachweisen. Weder im GAG-Assay noch in der

Proteoglykanfärbung konnte ein Unterschied zur unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden.

Beide Konzentrationen von SP fördern den Übergang der Zellen in einen hypertrophen Zustand, während Stimulation mit 10^{-10} M SP den Chondrogenese-Prozess positiv zu beeinflussen scheint, bewirkt 10^{-8} M SP eine Verlangsamung chondrogener Prozesse.

5.4 Die konzentrationsabhängige Wirkung von αCGRP auf die Inflammation während der chondrogenen Differenzierung

In unserem Versuchssetting lässt sich für αCGRP vor allem eine konzentrationsabhängige Wirkung auf mesenchymale Stammzellen ableiten.

Eine Stimulation mit 10^{-10} M αCGRP bewirkte bei ausgewählten katabolen Zytokinen (IL6, IL8 und TNFα) eine überwiegend reduzierte Expression entweder im Vergleich mit unstimulierten Zellen oder in der Verlaufsdarstellung. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits 1997 durch eine Studie von Millet und Vignery gemacht. Dabei wurde festgestellt, dass Osteoblasten unter Stimulation mit αCGRP vermindert TNFα exprimierten (Millet und Vignery 1997). Allerdings zeigte diese Studie eine Hochregulierung von IL6, was auch Parallelen zu unseren Daten aufweist, da hier die Reduktion im Verlauf (unstimulierten Kontrolle) fehlte und so eine stabilisierende Wirkung auf die Produktion des IL6 durch die Stimulation angenommen werden könnte. Trotz dieses Ergebnisses vermuteten Millet und Vignery, dass αCGRP vorwiegend anti-inflammatorische Prozesse der Osteoblasten fördern. Unsere Ergebnisse lassen einen ähnlichen Rückschluss zu.

Unsere Daten demonstrieren allerdings weiterhin, dass eine Stimulierung mit 10^{-8} M αCGRP bei undifferenzierten hMSC die IL1β Produktion und während des Chondrogenesevorganges die TNFα-Bildung verstärkt.

IL1β wirkte inhibierend auf die Synthese der EZM, indem es die anabolen Aktivitäten der Chondrozyten hemmte. So wiesen Chondrozyten nach IL1β Stimulation eine Reduktion der Kollagen II Synthese auf (Goldring et al. 1994). Liu *et al.* fanden zudem heraus, dass synoviale MSC nach IL1β Stimulation mit einer beeinträchtigten chondrogenen Differenzierung reagieren (Liu et al. 2017).

Dies könnte auch in unserem Versuchsmodel als weitere mögliche Erklärung unserer Ergebnisse für die gehemmte chondrogene Differenzierung, wie in Kapitel 5.6 genauer erklärt wird, nach αCGRP-Stimulation dienen. Allerdings konnten wir nur Änderungen in der Genexpression nachweisen, da mittels ELISA kein Nachweis von IL1ß im Zellkulturmedium gelang.

Während αCGRP in mononukleären Zellen des peripheren Blutes die Genexpression von TNFα steigerte (Cuesta et al. 2002), führte es zu einer Reduktion der TNFα-Genexpression in Osteoblasten (Millet und Vignery 1997). Weiterhin kamen bisherige Untersuchungen in

Bezug auf die Chondrogenese abhängig vom ausgewählten Zelltyp, der Konzentration und der Stimulationsdauer zu teils konträren Ergebnissen. Stimulation mit TNFα bewirkte bei hMSC, dass Aggrecan vermindert produziert, und katabole Enzyme, wie MMPs, vermehrt sezerniert wurden (Wehling et al. 2009). TNFα soll auch die Kollagenproduktion von Chondrozyten via NF-κB Aktivierung inhibieren (Séguin und Bernier 2003). Wie Jagielski *et al.* in ihrem Projekt allerdings zeigen konnten, hatte TNFα keinen signifikanten Einfluss auf die chondrogene Differenzierung der hMSC (Jagielski *et al.* 2014). Auch die Autoren Shioda *et al.* sahen keinen Unterschied im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bei der chondrogenen Differenzierung der synovialen MSC, wenn diese mit TNFα stimuliert wurden (Shioda et al. 2017). Allerdings wurde während der chondrogenen Differenzierung der synovialen MSC dem Differenzierungsmedium BMP7 zur Steigerung der Differenzierung hinzugefügt, was den Vergleich unserer Daten mit denen der Arbeitsgruppe Shioda schwierig macht. Ein weiterer limitierender Faktor dieser Arbeiten stellt die Konzentration an zugegebenen TNFα dar. Während in der Synovialflüssigkeit eines Patienten, der an Rheumatoider Arthritis leidet, durchschnittlich 300 pg/ml TNFα nachgewiesen werden konnten, stimulierten die Autoren Reginato und Jagielski mit einer bis zu 10-fach höheren Konzentration zwischen 10 und 25 ng/ml (Abe et al. 2014). In Bezug auf unsere Arbeit kann keine Aussage getroffen werden, inwiefern das von den hMSC produzierte TNFα Einfluss auf die hMSC während ihrer chondrogenen Differenzierung nimmt, da keine Untersuchungen bezüglich der Proteinmenge im chondrogenen Medium vorgenommen wurden.

In unserem Projekt lässt sich ein konzentrationsabhängiger Einfluss von αCGRP auf die Inflammation vermuten. Während 10^{-10} M αCGRP die Expression kataboler Markergene (IL6, IL8, TNFα) inhibiert und somit eine anti-inflammatorische Rolle einnimmt, ließ sich nach Stimulation mit 10^{-8} M αCGRP eine vermehrte Genexpression von IL1ß und TNFα nachweisen, was als weitere Ursache einer hemmenden Wirkung auf die Chondrogenese gesehen werden könnte.

5.5 Konzentrationsabhängige Rolle von αCGRP in der Zellvitalität

Apoptose:

Unsere Beobachtungen deuten daraufhin, dass eine Stimulation mit αCGRP die Genexpression von BCL2 und dadurch möglicherweise Apoptoseprozesse von hMSC beeinflussen könnte. In der Verlaufsdarstellung war nur an Tag 14, nicht aber an Tag 21 wie bei den unstimulierten Kontrollzellen, eine verstärkte Expression nachweisbar. Dies könnte darauf hinweisen, dass αCGRP je nach Differenzierungsstadium der hMSC unterschiedlich auf die BCL2-Genexpression wirkt. Die Stimulation mit der niedrigeren Konzentration (10^{-10} M) induzierte zudem eine verminderte Expression von BCL2 an Tag 28, was auf eine konzentrationsabhängige Wirkung von αCGRP schließen lässt.

Die Ergebnisse werden durch Untersuchungen von Liang *et al.* unterstützt. Sie konnten feststellen, dass αCGRP insbesondere in der frühen Phase der Kultivierung, also nach 7 Tagen, die Apoptoserate von hMSC, isoliert aus osteoporotischem Knochen, konzentrationsabhängig reduzierte (Liang et al. 2015). Im Verlauf der Chondrogenese ändert sich also die Wirkung der αCGRP Stimulation.
Dies lässt vermuten, dass αCGRP das Überleben von hMSC während ihrer chondrogenen Differenzierung konzentrationsabhängig und in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus beeinflusst.
Da αCGRP seine proapoptotische Wirkung wahrscheinlich nicht nur über den intrinsischen Signalweg, an dem BCL2 beteiligt ist, vermittelt, ist für eine fundierte Aussage über einen möglichen Apoptose-fördernden oder –hemmenden Einfluss von αCGRP auf hMSC während der chondrogenen Differenzierung die Untersuchung weiterer am Apoptoseprozess beteiligter Proteine notwendig.

Proliferation:

Die Stimulation der hMSC mit 10^{-10} M αCGRP führte in unserem Projekt zu einer Steigerung der Cyclin D1-Expression auf Proteinebene, und in der Durchflusszytometrie konnte eine verminderte Anzahl der Zellen in der G2-Phase nachgewiesen werden. αCGRP scheint also einen schnellen Übertritt von der G1- in die S- Phase zu begünstigen, allerdings werden Prozesse in der S-Phase verlangsamt oder aber es kommt zu einem Stopp aufgrund von DNA-Schäden in der S-Phase, weshalb weniger Zellen in der G2-Phase vorhanden waren.
Ein proliferationsfördernder Effekt von αCGRP konnte bereits in einigen Arbeitsgruppen gezeigt werden. αCGRP inhibiert den MAPK Signalweg in endothelialen Vorläuferzellen, was zu einer vermehrten Produktion von Cyclin D1 und -E führt und im Zellzyklus zu einem vermehrten Zellanteil in der S- und G2/M-Phase (Wu et al. 2018). Zudem soll αCGRP die Zellviabilität fördern, da nach 2 Tagen Stimulation mit αCGRP eine Zunahme der Zellgröße und eine erhöhte proliferative Aktivität mittels MTT-Assay gemessen werden konnte (Liang et al. 2015).
Xu und Jiang fanden in ihrem Projekt heraus, dass nach 10^{-8} M αCGRP-Stimulation vermehrt Zellen in der S-Phase verbleiben, allerdings ist in der Durchflusszytometrie das Verhältnis G2/G1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe gesteigert. Sie folgern daraus, dass die Zellen vermehrt DNA produzieren und in die Mitosephase übergehen (Xu und Jiang 2014). Unsere Experimente basieren allerdings auf einem Serumentzug, während die Autoren nach dem passagieren eine kontinuierliche Stimulation durchführten, was den Vergleich der Daten erschwert. Villa *et al.* untersuchten humane Osteoblasten und konnten eine erhöhte Proliferation dieser in konzentrationsabhängiger 24 Stunden-Stimulierung mit αCGRP feststellen. Sie konnten nachweisen, dass αCGRP mittels Proteinkinase C (PKC)-

Aktivierung Einfluss auf die Proliferation hat, da keine reduzierte Proliferationsrate nach Zugabe eines nicht spezifischen PKC-Antagonistens dokumentiert werden konnte (Villa et al. 2003).

Es bleibt abzuklären, inwiefern αCGRP über die Regulation des Zellzykluses Einfluss auf die Proliferationsaktivität von MSC hat. Allerdings erscheint zusammenfassend eine konzentrationsabhängige, proliferationsfördernde Wirkung wahrscheinlich.

5.6 αCGRP als Hemmfaktor der Chondrogenese

Unsere Daten demonstrieren, dass sich vor allem die Stimulation mit 10^{-8} M αCGRP als Hemmfaktor der Chondrogenese herausstellte. Es konnte eine verminderte SOX9 RNA-Genexpression, weniger aktives Phospho-Sox9, sowie ein reduziertes Phospho-Sox9/Sox9 Verhältnis dokumentiert werden. Des Weiteren zeigte sich in der Genexpressionsanalyse an Tag 28 eine deutlich reduzierte Expression von COL2A1 und COL10A1. Im zeitlichen Verlauf fielen vor allem der späte Anstieg der COL2A1 Expression und der fehlende Anstieg der COL10A1 Expression auf. Dies spiegelte sich auch in der Produktion der GAG wieder. So war an Tag 28 eine verringerte Synthese nach 10^{-8} M αCGRP-Stimulation feststellbar. Der Gehalt an Kollagen II war ebenfalls deutlich an Tag 21 reduziert.

Dass αCGRP die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten inhibiert, konnten die Autoren Edoff und Hildebrand bereits 2003 zeigen. Chondrozyten reagieren auf αCGRP Stimulation mit einer erhöhten cAMP Produktion (Edoff und Hildebrand 2003). Eine lokale Ausschüttung von cAMP verzögert nicht nur den Prozess der chondrogenen Hypertrophie und dadurch die terminale Differenzierung, sondern es bewirkt auch eine Verlangsamung der Matrix-Mineralisierung (Jikko et al. 1996, Grassel 2014). Die Ergebnisse der Alcianblau-färbungen ergaben allerdings keine Unterschiede der stimulierten Gruppen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in Bezug auf vermehrte hypertrophe Morphologie der Zellen oder Intensität der Färbung, und damit in der Struktur der EZM. Zur weiteren Verifizierung unserer Ergebnisse wäre eine Untersuchung von weiteren Marker des hypertrophen Signalweges wie z. B. MMP13 oder die Analyse auf Proteinebene mittels eines Kollagen X ELISAs sinnvoll.

Betrachtet man die Ergebnisse der 10^{-10} M αCGRP Stimulation, so konnten wir an Tag 28 eine verminderte SOX9 Genexpression und einen fehlenden Anstieg der COL2A1 Genexpression feststellen. Korrelierend dazu fanden wir eine reduzierte Produktion von Phospho-Sox9. Hinsichtlich der COL10A1 Genexpression, Kollagen II-Proteinbiosynthese oder des GAG/DNA-Gehalt ergaben sich allerdings keine Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Im vorliegenden Versuchssetting wiesen die hMSC zudem nach 10^{-10} M αCGRP Stimulation eine verringerte Expression von ITGA10 auf. Die Autoren Varas *et al.* stimulierten hMSC mit

FGF2 und konnten so beobachten, dass ein Anstieg der Genexpression von ITGA10 ab Tag 3 des Versuchszeitraumes auch mit einem Anstieg ausgewählter chondrogener Marker zusammenhing (Varas *et al.* 2007). Basierend auf diesen Daten, vermuteten die Autoren eine Rolle des ITGA10 bei der Steuerung der Differenzierung der hMSC (Varas *et al.* 2007). Allerdings ist die Erhöhung von ITGA10 erst ab Tag 11 biologisch signifikant feststellbar und proportional zum Anstieg der COL2A1 Genexpression, weshalb diese Ergebnisse auch im Hinblick auf unsere Beobachtungen nur einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion geben (Camper et al. 2001).

Unsere Daten zeigen also eine konzentrationsabhängige αCGRP-abhängige Inhibition der Chondrogenese und der Zellhypertrophie.

5.7 Konzentrationsabhängige Rolle der SP- und αCGRP Stimulationen

Der NK1R und der CGRP-Rezeptor gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptor Familien. Wie bereits erwähnt, gibt es unterschiedliche intrazelluläre Signalwege, die je nach spezifischer Untereinheit aktiviert werden. Möglicherweise führen die unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden zu intra- und extrazellulären Veränderungen, weshalb es zur Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine kommt. In Bezug auf SP und seinen Rezeptor könnte ein Mangel an SP zu einem Kompensationsmechanismus führen, der zu einem Wechsel der G-Proteinuntereinheit führt. Vice versa könnte eine Überstimulation zu einer Aktivierung eines anderen, möglicherweise den Effekt des Stimulanz inhibierenden Signalweges führen. In der Literatur ist ein Umschalten des adrenergen β_2-Rezeptors von einer Gs- zu einer Gi-Kopplung nach Proteinkinase-A-(PKA)-Phosphorylierung beschrieben. Da PKA direkt durch G_s stimuliert wird, hat diese Phosphorylierung auch die Funktion eines negativen Feedbackloops (Daaka et al. 1997).

Weiterhin existieren zwei verschiedene Varianten des NK1R: eine unverzweigte und eine am C-terminalen Ende verzweigte Form. Je nach NK1R Subtypus werden verschiedene Signalwege angeschaltet und damit unterschiedliche Effekte auf metabolische Prozesse induziert. Lai *et al.* konnten je nach vorliegender Variante einen Ca^{2+} abhängigen- oder Ca^{2+} unabhängigen Signalweg nachweisen (Lai et al. 2008).

In der Literatur ist ein Umschalten des β2-Rezeptors von einer Gs- zu einer Gi-Kopplung nach PKA-Phosphorylierung beschrieben (Daaka *et al.*, 1997a). Eine weitere Studie von Jenei-Lanzl *et al.* untersuchte das Verhalten von synovialen Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Unter hypoxischen Bedingungen kam es zu einer unerwarteten pro-inflammatorischen Reaktion, da ein Switch der G-Protein-Untereinheit ($G_{\alpha s}$ zu $G_{\alpha i}$) durch Änderung des Umgebungsmilieus initiiert wurde (Jenei-Lanzl et al. 2015).

Eine Erklärung für die konzentrationsabhängigen Ergebnisse nach αCGRP-Stimulation könnte sich durch die Funktionalität des CGRP Rezeptors geben. Die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Subtypen könnte von der konzentrationsabhängig unterschiedlich starken Aktivität des RCP abhängen. So wurde mit Hilfe in NIH3T3-Zellen (murine Fibroblasten) gezeigt, dass der Verlust von RCP mit einer Verminderung der CGRP- und Adrenomedullin-vermittelten Signaltransduktion einherging. Die Affinität und die CGRP-Rezeptordichte blieben hingegen unbeeinflusst (Evans et al. 2000).

6 Zusammenfassung

Über die Ausschüttung von sensiblen Neurotransmittern wie Substanz P (SP) und α-Calcitonin gene-related peptide (αCGRP) kann das Nervensystem unter anderem die physiologischen und pathologischen Vorgänge im artikulären Knorpel modulieren.
Kommt es zu chondralen oder osteochondralen Läsionen des Knorpels, sind die mesenchymalen Stammzellen eine vielversprechende Quelle für eine Knorpelregeneration.
Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass das sensible Nervensystem durch die Neurotransmitter SP und αCGRP in Abhängigkeit der Konzentration die chondrogene Differenzierung und die Zellvitalität von mesenchymalen Stammzellen beeinflusst.
In mesenchymalen Stammzellen wurde nach SP-Stimulation konzentrationsabhängig die Zellvitalität beeinflusst. Über eine gesteigerte Cyclin D1 Bildung und vermehrten Übergang in die S-Phase auf Zellzyklusebene förderte die geringe SP Konzentration (10^{-10} M) die Proliferation der undifferenzierten hMSC. Nach Stimulation der hMSC mit einer hohen SP Konzentration wurde kein Einfluss auf die Verteilung im Zellzyklus beobachtet.
Nach SP Stimulation (mit beiden Konzentrationen) wird BCL2 an Tag 21 verstärkt nachgewiesen. Da jedoch nach 10^{-10} M SP Stimulation BCL2 an Tag 28 vermindert exprimiert wurde, könnte also vermutet werden, dass SP in der frühen Phase der Differenzierung die hMSC vor Apoptose schützt und in der niedrigen Konzentration in der späten Differenzierungsphase die Apoptose fördert.
Beide SP-Konzentrationen förderten den Übergang der Zellen in einen hypertrophen Zustand, da bereits nach Tag 7 hypertrophe Marker wie Kollagen X (beide Konzentrationen) und VEGFα (10^{-10} M SP) hochreguliert wurden. Zugleich wurden die chondrogenen Prozesse möglicherweise durch die 10^{-8} M SP-Stimulation verlangsamt, da nach Tag 21 chondrogener Differenzierung weiterhin mesenchymale Stammzellmarker (COL1A1) nachweisbar waren und SOX9 und FGF2 vermindert exprimiert wurden. Die Stimulation mit 10^{-10} M SP förderte möglicherweise die Chondrogenese, da es nach Tag 14 chondrogener Differenzierung zur signifikanten Reduktion von COL1A1 kam und ausgewählte chondrogene Marker vermehrt exprimiert wurden. Allerdings ergaben der Kollagen-Typ II-ELISA, die Glykosaminoglykanproduktion oder die Aggrekanfärbung unserer Zellaggregate keine signifikanten Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass 10^{-10} M αCGRP die Expression ausgewählter kataboler Markergene inhibiert, während mit der höheren Konzentration (10^{-8} M) von αCGRP die Genexpression kataboler Zytokine induziert wurden, was als weitere Ursache der hemmenden Wirkung auf die Chondrogenese der hMSC gesehen werden kann. Stimulation mit 10^{-10} M αCGRP könnte pro-apoptotisch auf MSC während eines fortgeschrittenen chondrogenen Prozesses wirken, indem es die Genexpression von BCL2 hemmt. Bei

Stimulation mit der niedrigen Konzentration von αCGRP zeigte sich eine gesteigerte Cyclin D1 Produktion, was positiv auf die Proliferationsaktivität der hMSC wirken könnte. Reduzierter GAG-Gehalt, später Anstieg der COL2A1 Expression und der fehlende Anstieg der COL10A1 Expression, machten den inhibierenden Einfluss der αCGRP Stimulation auf die Chondrogenese deutlich.

Die konzentrationsabhängigen Effekte könnten sich durch die Physiologie der G-Protein gekoppelten Neuropeptidrezeptoren erklären. Möglicherweise führen die unterschiedlichen Konzentrationen der Liganden zu intra- und extrazellulären Veränderungen, weshalb es zur Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine kommt und so zu teils konträren Ergebnissen.

Wünschenswert, zur weiteren Untersuchung der Zellvitalität, wären Studien zur genaueren Analyse der Proteinbiochemie und zu möglichen αCGRP-/SP-abhängigen Signalwegen. Des Weiteren erscheint es sinnvoll die Rolle des αCGRP als Hemmfaktor der Chondrogenese im Hinblick auf klinische Therapieverfahren, die hMSC einsetzen, zu beachten.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
αMEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
°C	Grad Celsius
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
µmol/l	Mikromol pro Liter
A_2P	Ascorbin-2 Phosphat
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantat
ALP	Alkalische Phosphatase
AR	Adrenozeptoren/Adrenerge Rezeptoren
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	BCL2 antagonist of cell death
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
BCL	B-cell lymphoma
BMP	bone morphogenetic protein
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDK	Cyclin-abhängigen Proteinkinasen
CDK-I	CDK-Inhibitorproteinen
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CMP	common myeloid precursors (myeloide Vorläuferzellen)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COL	Kollagen
COMP	cartilage oligomeric protein
CREB	cAMP response element-binding
CRLR/CLR	calcitonin receptor-like receptor
DAG	Diacylglycerin
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMMB	Dimethylmethylenblau
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
ER	endoplasmatischen Retikulums
ERK	extracellular-signal regulated kinases
et al.	und andere
EZM	extrazellulären Matrix
FasR/FasL	Fas-Rezeptor/Fas-Ligand
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FGF	fibroblastic growth factor
G	Gauge
GAG	Glykosaminoglykan
GPCR	G-protein-coupled receptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GSK 3	Glykogensynthase-Kinase **3**
h	Stunde/n
HE	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
H2SO4	Dihydrogensulfat
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen (stem cells)
HLA-DR	*human leukocyte antigen-antigen D relate*d
HSC	hematopoietic stem cells (hämatopoetische Stammzellen)
HRP	Meerrettichperoxidase
IGF-1	Insulin-like growth factor
IHH	indian hedgehog
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITGA	Integrin
KCl	Kaliumchlorid
KH2PO4	Kaliumdihydrogenphosphat
log2	Logarithmus zur Basis 2
mA	Miliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol pro Liter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mol	Einheit Stoffmenge
mol/l	Mol pro Liter
mRNA	messenger RNA
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid

neural cadherin (N-cadherin	neural cadherin (N-cadherin
neural cell adhesion molecule (N-CAM)	neural cell adhesion molecule (N-CAM)
NF-ĸB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B- cells
NFATC1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
ng	Nanogramm
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NK-R	Neurokinin-Rezeptor/Tachikinin-Rezeptor
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
nmol/l	Nanomol pro Liter
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OA	Osteoarthrose
OATS	osteochondrale autologe Knorpel-Knochen-Transplantations-System
OPD	o-Phenylenediamine dihydrochloride
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-Salz-Puffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA, PKC	Proteinkinase A , Proteinkinase C
pM	pikomolar
pg	pikogramm
pH	pH-Wert
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PTHrP/Ihh	Parathyreoid Hormone related Peptide/Indian Hedgehog
PPT-I	bzw. PPT-A, Tac1, Preprotachykinin I-Gen
PPT-II	bzw. PPT-B, Preprotachykinin II-Gen
qPCR	quantitative real time polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kenttenreaktion)
RAMP	receptor activity modifing proteine
RANK	Receptor Activator of NF-ĸB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RB	Retinoblastom-Protein
RCP	R*eceptor component protein*
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationstest-*Puffer*
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
ROX	5-Carboxy-Rhodamin-X
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RUNX2	Runt-realted transcription factor 2
Sec	Sekunde/n
SDS	sodium dodecyl sulfate,

	Natriumdodecylsulfat
shRNA	small harpin RNA
SOX	SRY-related high-mobility group [HMG] bo
SP	Substanz P
STAT	*Signal* Transducers and Activators of Transcription
TBS	Tris-buffered saline, Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE Puffer	TRIS- und EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer
TGFβ	transforming growth factor β
TNFα	tumor necrosis factor alpha
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGFα	Vascular endothelial growth factor alpha
WT	Wildtyp
Wnt-Signalweg	Wingless and Int-1 -Signalweg
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Literaturverzeichnis

Abe, H.; Sakai, T.; Ando, W.; Takao, M.; Nishii, T.; Nakamura, N. et al. (2014): Synovial joint fluid cytokine levels in hip disease. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 53 (1). DOI: 10.1093/rheumatology/ket334.

Aizawa, T.; Kon, T.; Einhorn, T. A.; Gerstenfeld, L. C. (2001): Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 19 (5), S. 785–796. DOI: 10.1016/S0736-0266(00)00078-4.

Akiyama, Haruhiko (2011): Transcriptional regulation in chondrogenesis by Sox9. In: *Clinical calcium* 21 (6), S. 845–851.

Akiyama, Haruhiko; Lefebvre, Véronique (2011): Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 29 (4), S. 390–395. DOI: 10.1007/s00774-011-0273-9.

Amara, S. G.; Jonas, V.; Rosenfeld, M. G.; Ong, E. S.; Evans, R. M. (1982): Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. In: *Nature* 298 (5871), S. 240–244.

Arnold, Michael A.; Kim, Yuri; Czubryt, Michael P.; Phan, Dillon; McAnally, John; Qi, Xiaoxia et al. (2007): MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. In: *Developmental cell* 12 (3), S. 377–389. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.02.004.

Backman, Ludvig J.; Eriksson, Daniella E.; Danielson, Patrik (2014): Substance P reduces TNF-α-induced apoptosis in human tenocytes through NK-1 receptor stimulation. In: *British journal of sports medicine* 48 (19), S. 1414–1420. DOI: 10.1136/bjsports-2013-092438.

Baksh, D.; Song, L.; Tuan, R. S. (2004): Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 8 (3), S. 301–316. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x.

Baksh, Dolores; Yao, Raphael; Tuan, Rocky S. (2007): Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (6), S. 1384–1392. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0709.

Bell, D. M.; Leung, K. K.; Wheatley, S. C.; Ng, L. J.; Zhou, S.; Ling, K. W. et al. (1997): SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. In: *Nature genetics* 16 (2), S. 174–178. DOI: 10.1038/ng0697-174.

Beneke, G.; Endres, O.; Becker, H.; Kulka, R. (1966): Uber Wachstum und Degeneration des Trachealknorpels. In: *Virchows Archiv fur pathologische Anatomie und Physiologie und fur klinische Medizin* 341 (4), S. 365–380.

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.; Deng, J. M.; Zhang, Z.; Behringer, R. R.; Crombrugghe, B. de (1999): Sox9 is required for cartilage formation. In: *Nature genetics* 22 (1), S. 85–89. DOI: 10.1038/8792.

Blumer, Michael J. F.; Longato, Stefano; Richter, Elisabeth; Pérez, Maria Teresa; Konakci, Kadriye Zeynep; Fritsch, Helga (2005): The role of cartilage canals in endochondral and perichondral bone formation: are there similarities between these two processes? In: *Journal of anatomy* 206 (4), S. 359–372. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2005.00404.x.

Borzi, R. M.; Mazzetti, I.; Macor, S.; Silvestri, T.; Bassi, A.; Cattini, L.; Facchini, A. (1999): Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. In: *FEBS letters* 455 (3), S. 238–242. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)00886-8.

Brain, S. D. (1997): Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. In: *Immunopharmacology* 37 (2-3), S. 133–152. DOI: 10.1016/s0162-3109(97)00055-6.

Brandt, K. D.; Radin, E. L.; Dieppe, P. A.; van de Putte, L. (2006): Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. In: *Annals of the rheumatic diseases* 65 (10), S. 1261–1264. DOI: 10.1136/ard.2006.058347.

Brittberg, M.; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Ohlsson, C.; Isaksson, O.; Peterson, L. (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. In: *The New England journal of medicine* 331 (14), S. 889–895. DOI: 10.1056/NEJM199410063311401.

Bruns, J.; Steinhagen, J. (1999): Transplantation chondrogener Gewebe zur Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. In: *Der Orthopade* 28 (1), S. 52–60. DOI: 10.1007/s001320050321.

Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J. (1998): Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. In: *Instructional course lectures* 47, S. 487–504.

Camper, L.; Holmvall, K.; Wängnerud, C.; Aszódi, A.; Lundgren-Akerlund, E. (2001): Distribution of the collagen-binding integrin alpha10beta1 during mouse development. In: *Cell and tissue research* 306 (1), S. 107–116. DOI: 10.1007/s004410100385.

Caplan, Arnold I.; Dennis, James E. (2006): Mesenchymal stem cells as trophic mediators. In: *Journal of cellular biochemistry* 98 (5), S. 1076–1084. DOI: 10.1002/jcb.20886.

Carballo, Camila B.; Nakagawa, Yusuke; Sekiya, Ichiro; Rodeo, Scott A. (2017): Basic Science of Articular Cartilage. In: *Clinics in sports medicine* 36 (3), S. 413–425. DOI: 10.1016/j.csm.2017.02.001.

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.

Coffin, J. D.; Florkiewicz, R. Z.; Neumann, J.; Mort-Hopkins, T.; Dorn, G. W.; Lightfoot, P. et al. (1995): Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. In: *Molecular biology of the cell* 6 (12), S. 1861–1873.

Colnot, Céline; Lu, Chuanyong; Hu, Diane; Helms, Jill A. (2004): Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development. In: *Developmental biology* 269 (1), S. 55–69. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.01.011.

Csaki, C.; Matis, U.; Mobasheri, A.; Ye, H.; Shakibaei, M. (2007): Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. In: *Histochemistry and cell biology* 128 (6), S. 507–520. DOI: 10.1007/s00418-007-0337-z.

Cuesta, M. C.; Quintero, L.; Pons, H.; Suarez-Roca, H. (2002): Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. In: *Neurochemistry international* 40 (4), S. 301–306.

Daaka, Y.; Luttrell, L. M.; Lefkowitz, R. J. (1997): Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. In: *Nature* 390 (6655), S. 88–91. DOI: 10.1038/36362.

Diehl, Peter; Gerdesmeyer, Ludger; Schauwecker, Johannes; Kreuz, Peter Cornelius; Gollwitzer, Hans; Tischer, Thomas (2013): Konservative Therapie der Gonarthrose. In: *Der Orthopäde : Organ der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie : Organ der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie : Organ der Österreichischen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie* 42 (2), S. 125–139.

Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.

Dubon, Maria Jose; Park, Ki-Sook (2015): Substance P enhances the proliferation and migration potential of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cell-like cell lines. In: *Experimental and therapeutic medicine* 9 (4), S. 1185–1191. DOI: 10.3892/etm.2015.2291.

Edoff, K.; Hildebrand, C. (2003): Neuropeptide effects on rat chondrocytes and perichondrial cells in vitro. In: *Neuropeptides* 37 (5), S. 316–318.

Eirin, Alfonso; Zhu, Xiang-Yang; Krier, James D.; Tang, Hui; Jordan, Kyra L.; Grande, Joseph P. et al. (2012): Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 30 (5), S. 1030–1041. DOI: 10.1002/stem.1047.

Evans, B. N.; Rosenblatt, M. I.; Mnayer, L. O.; Oliver, K. R.; Dickerson, I. M. (2000): CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (40), S. 31438–31443. DOI: 10.1074/jbc.M005604200.

Fazekas de St Groth, S.; Webster, R. G.; Datyner, A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. In: *Biochimica et biophysica acta* 71, S. 377–391.

Felson, David T. (2009): Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. In: *Arthritis research & therapy* 11 (1), S. 203. DOI: 10.1186/ar2531.

Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F.; Kulagina, N. N. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. In: *Experimental hematology* 4 (5), S. 267–274.

Friedenstein, A. J.; Petrakova, K. V.; Kurolesova, A. I.; Frolova, G. P. (1968): Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. In: *Transplantation* 6 (2), S. 230–247.

Frisbie, D. D.; Trotter, G. W.; Powers, B. E.; Rodkey, W. G.; Steadman, J. R.; Howard, R. D. et al. (1999): Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. In: *Veterinary surgery : VS* 28 (4), S. 242–255.

Fu, Su; Jin, Dan; Liu, Song; Wang, Lei; Wang, Zhao; Mei, Gang et al. (2015): Protective Effect of Neuropeptide Substance P on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells against Apoptosis Induced by Serum Deprivation. In: *Stem cells international* 2015. DOI: 10.1155/2015/270328.

Fu, Su; Mei, Gang; Wang, Zhao; Zou, Zhen-Lv; Liu, Song; Pei, Guo-Xian et al. (2014): Neuropeptide substance P improves osteoblastic and angiogenic differentiation capacity of bone marrow stem cells in vitro. In: *BioMed research international* 2014, S. 596023. DOI: 10.1155/2014/596023.

Fukuchi, Yumi; Nakajima, Hideaki; Sugiyama, Daisuke; Hirose, Imiko; Kitamura, Toshio; Tsuji, Kohichiro (2004): Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22 (5), S. 649–658. DOI: 10.1634/stemcells.22-5-649.

Gao, Jiao; Yan, Xin-Long; Li, Ren; Liu, Yi; He, Wenyan; Sun, Shengkun et al. (2010): Characterization of OP9 as authentic mesenchymal stem cell line. In: *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 37 (7), S. 475–482. DOI: 10.1016/S1673-8527(09)60067-9.

Garcia-Recio, Susana; Gascón, Pedro (2015): Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. In: *BioMed research international* 2015, S. 495704. DOI: 10.1155/2015/495704.

Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T. (2003): Collagens--structure, function, and biosynthesis. In: *Advanced drug delivery reviews* 55 (12), S. 1531–1546. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002.

Gerard, Norma P.; Bao, Lu; Xiao-Ping, He; Gerard, Craig (1993): Molecular aspects of the tachykinin receptors. In: *Regulatory peptides* 43 (1-2), S. 21–35. DOI: 10.1016/0167-0115(93)90404-V.

Glasson, S. S.; Chambers, M. G.; van den Berg, W. B.; Little, C. B. (2010): The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. In: *Osteoarthritis and cartilage* 18 Suppl 3, S17-23. DOI: 10.1016/j.joca.2010.05.025.

Glyn-Jones, S.; Palmer, A. J. R.; Agricola, R.; Price, A. J.; Vincent, T. L.; Weinans, H.; Carr, A. J. (2015): Osteoarthritis. In: *Lancet (London, England)* 386 (9991), S. 376–387. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60802-3.

Goldring, M. B.; Fukuo, K.; Birkhead, J. R.; Dudek, E.; Sandell, L. J. (1994): Transcriptional suppression by interleukin-1 and interferon-gamma of type II collagen gene expression in human chondrocytes. In: *Journal of cellular biochemistry* 54 (1), S. 85–99. DOI: 10.1002/jcb.240540110.

Goldring, Mary B.; Goldring, Steven R. (2010): Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192, S. 230–237. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x.

Goldring, Mary B.; Tsuchimochi, Kaneyuki; Ijiri, Kosei (2006a): The control of chondrogenesis. In: *Journal of cellular biochemistry* 97 (1), S. 33–44. DOI: 10.1002/jcb.20652.

Goldring, Mary B.; Tsuchimochi, Kaneyuki; Ijiri, Kosei (2006b): The control of chondrogenesis. In: *Journal of cellular biochemistry* 97 (1), S. 33–44. DOI: 10.1002/jcb.20652.

Goto, Tetsuya; Tanaka, Teruo (2002): Tachykinins and tachykinin receptors in bone. In: *Microscopy research and technique* 58 (2), S. 91–97. DOI: 10.1002/jemt.10123.

Grassel, Susanne G. (2014): The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. In: *Arthritis research & therapy* 16 (6), S. 485.

Greene, George W.; Banquy, Xavier; Lee, Dong Woog; Lowrey, Daniel D.; Yu, Jing; Israelachvili, Jacob N. (2011): Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (13), S. 5255–5259. DOI: 10.1073/pnas.1101002108.

Grifka, J.; Anders, S.; Löhnert, J.; Baag, R.; Feldt, S. (2000): Regeneration von Gelenkknorpel durch die autologe Chondrozytentransplantation. In: *Arthroskopie* 13 (3), S. 113–122. DOI: 10.1007/s001420050145.

Haase, Elisabeth; Lange, Toni; Lützner, Jörg; Kopkow, Christian; Petzold, Thomas; Günther, Klaus-Peter; Schmitt, Jochen (2015): Indikation zur endoprothetischen Versorgung des Kniegelenks - ein Evidence Mapping. In: *Zeitschrift fur Evidenz, Fortbildung und Qualitat im Gesundheitswesen* 109 (8), S. 605–614. DOI: 10.1016/j.zefq.2015.09.029.

Haleem, Amgad M.; Singergy, Abdel Aziz El; Sabry, Dina; Atta, Hazem M.; Rashed, Laila A.; Chu, Constance R. et al. (2010): The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. In: *Cartilage* 1 (4), S. 253–261. DOI: 10.1177/1947603510366027.

Hall, B. K.; Miyake, T. (1992): The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. In: *Anatomy and embryology* 186 (2), S. 107–124.

Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Löffler, Georg (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).

Hermida-Gómez, Tamara; Fuentes-Boquete, Isaac; Gimeno-Longas, Maria José; Muiños-López, Emma; Díaz-Prado, Silvia; Toro, Francisco Javier de; Blanco, Francisco Javier (2011): Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. In: *The Journal of rheumatology* 38 (2), S. 339–349. DOI: 10.3899/jrheum.100614.

Herrera, R. E.; Chen, F.; Weinberg, R. A. (1996): Increased histone H1 phosphorylation and relaxed chromatin structure in Rb-deficient fibroblasts. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (21), S. 11510–11515. DOI: 10.1073/pnas.93.21.11510.

Hill, D. J.; Logan, A.; Ong, M.; Sousa, D. de; Gonzalez, A. M. (1992): Basic fibroblast growth factor is synthesized and released by isolated ovine fetal growth plate chondrocytes: potential role as an autocrine mitogen. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 6 (4), S. 277–294.

Huang, G. T-J; Gronthos, S.; Shi, S. (2009): Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. In: *Journal of dental research* 88 (9), S. 792–806. DOI: 10.1177/0022034509340867.

Im, Hee-Jeong; Li, Xin; Muddasani, Prasuna; Kim, Gun-Hee; Davis, Francesca; Rangan, Jayanthi et al. (2008): Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. In: *Journal of cellular physiology* 215 (2), S. 452–463. DOI: 10.1002/jcp.21317.

Inoue, H.; Shimoyama, Y.; Hirabayashi, K.; Kajigaya, H.; Yamamoto, S.; Oda, H.; Koshihara, Y. (2001): Production of neuropeptide substance P by synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In: *Neuroscience letters* 303 (3), S. 149–152. DOI: 10.1016/s0304-3940(01)01713-x.

Jenei-Lanzl, Zsuzsa; Zwingenberg, Janika; Lowin, Torsten; Anders, Sven; Straub, Rainer H. (2015): Proinflammatory receptor switch from Gαs to Gαi signaling by β-arrestin-mediated PDE4 recruitment in mixed RA synovial cells. In: *Brain, behavior, and immunity* 50, S. 266–274. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.07.020.

Jikko, A.; Murakami, H.; Yan, W.; Nakashima, K.; Ohya, Y.; Satakeda, H. et al. (1996): Effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on chondrocyte terminal differentiation and cartilage-matrix calcification. In: *Endocrinology* 137 (1), S. 122–128. DOI: 10.1210/endo.137.1.8536602.

Karuppal, Raju (2017): Current concepts in the articular cartilage repair and regeneration. In: *Journal of orthopaedics* 14 (2), A1-A3. DOI: 10.1016/j.jor.2017.05.001.

Kondo, Masahiro; Yamaoka, Kunihiro; Sakata, Kei; Sonomoto, Koshiro; Lin, Lin; Nakano, Kazuhisa; Tanaka, Yoshiya (2015): Contribution of the Interleukin-6/STAT-3 Signaling Pathway to Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 67 (5), S. 1250–1260. DOI: 10.1002/art.39036.

Kowaltowski, Alicia J.; Cosso, Ricardo G.; Campos, Claudia B.; Fiskum, Gary (2002): Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (45), S. 42802–42807. DOI: 10.1074/jbc.M207765200.

Kubo, Seiji; Cooper, Gregory M.; Matsumoto, Tomoyuki; Phillippi, Julie A.; Corsi, Karin A.; Usas, Arvydas et al. (2009): Blocking vascular endothelial growth factor with soluble Flt-1 improves the chondrogenic potential of mouse skeletal muscle-derived stem cells. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (1), S. 155–165. DOI: 10.1002/art.24153.

Lai, Jian-Ping; Lai, Saien; Tuluc, Florin; Tansky, Morris F.; Kilpatrick, Laurie E.; Leeman, Susan E.; Douglas, Steven D. (2008): Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (34), S. 12605–12610. DOI: 10.1073/pnas.0806632105.

Lane, L. B.; Villacin, A.; Bullough, P. G. (1977): The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 59 (3), S. 272–278.

Leonard, Anna Victoria; Thornton, Emma; Vink, Robert (2014): NK1 receptor blockade is ineffective in improving outcome following a balloon compression model of spinal cord injury. In: *PloS one* 9 (5), e98364. DOI: 10.1371/journal.pone.0098364.

Lerner, U. H.; Persson, E. (2008): Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 8 (2), S. 154–165.

Li, Wen-Wu; Guo, Tian-Zhi; Liang, De-yong; Sun, Yuan; Kingery, Wade S.; Clark, J. David (2012): Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. In: *Anesthesiology* 116 (4), S. 882–895. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31824bb303.

Li, Xiaolei; Shang, Bingxue; Li, Ya-Nan; Shi, Yufang; Shao, Changshun (2019): IFNγ and TNFα synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. In: *Stem cell research & therapy* 10 (1), S. 18. DOI: 10.1186/s13287-018-1102-z.

Liang, Wei; Zhuo, Xianglong; Tang, Zhongfei; Wei, Xiaomou; Li, Bing (2015): Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation and osteogenic differentiation of osteoporotic rat-derived bone mesenchymal stem cells. In: *Molecular and cellular biochemistry* 402 (1-2), S. 101–110. DOI: 10.1007/s11010-014-2318-6.

Lieberthal, J.; Sambamurthy, N.; Scanzello, C. R. (2015): Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis. In: *Osteoarthritis and cartilage* 23 (11), S. 1825–1834. DOI: 10.1016/j.joca.2015.08.015.

Lim, Shuhui; Kaldis, Philipp (2013): Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. In: *Development (Cambridge, England)* 140 (15), S. 3079–3093. DOI: 10.1242/dev.091744.

Linsenmayer, T. F.; Toole, B. P.; Trelstad, R. L. (1973): Temporal and spatial transitions in collagen types during embryonic chick limb development. In: *Developmental biology* 35 (2), S. 232–239.

Liu, Da; Jiang, Lei-Sheng; Dai, Li-Yang (2007): Substance P and its receptors in bone metabolism. In: *Neuropeptides* 41 (5), S. 271–283. DOI: 10.1016/j.npep.2007.05.003.

Liu, Wenjing; Sun, Yangpeng; He, Yiqing; Zhang, Hong; Zheng, Youhua; Yao, Yu; Zhang, Zhiguang (2017): IL-1β impedes the chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells in the human temporomandibular joint. In: *International journal of molecular medicine* 39 (2), S. 317–326. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2832.

Loeffler, Markus; Potten, Christopher S. (1997): Stem cells and cellular pedigrees – a conceptual introduction. In: C. S. Potten (Hg.): Stem cells. London, San Diego: Academic Press, S. 1–27.

Loeser, Richard F. (2014): Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 39, S. 11–16. DOI: 10.1016/j.matbio.2014.08.007.

Loeser, Richard F.; Chubinskaya, Susan; Pacione, Carol; Im, Hee-Jeong (2005): Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. In: *Arthritis and rheumatism* 52 (12), S. 3910–3917. DOI: 10.1002/art.21472.

Loeser, Richard F.; Goldring, Steven R.; Scanzello, Carla R.; Goldring, Mary B. (2012): Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. In: *Arthritis and rheumatism* 64 (6), S. 1697–1707. DOI: 10.1002/art.34453.

Lüllmann-Rauch, Renate (2003): Histologie. Verstehen, Lernen, Nachschlagen ; 10 Tabellen. Stuttgart: Thieme.

Maggi, C. A.; Schwartz, T. W. (1997): The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. In: *Trends in pharmacological sciences* 18 (10), S. 351–355. DOI: 10.1016/s0165-6147(97)01107-3.

Magne, David; Vinatier, Claire; Julien, Marion; Weiss, Pierre; Guicheux, Jerome (2005): Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. In: *Trends in molecular medicine* 11 (11), S. 519–526. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.09.002.

Majkowska-Pilip, Agnieszka; Rius, Maria; Bruchertseifer, Frank; Apostolidis, Christos; Weis, Mirjam; Bonelli, Milton et al. (2018): In vitro evaluation of 225 Ac-DOTA-substance P for targeted alpha therapy of glioblastoma multiforme. In: *Chemical biology & drug design* 92 (1), S. 1344–1356. DOI: 10.1111/cbdd.13199.

Marsano, Anna; Medeiros da Cunha, Carolina M.; Ghanaati, Shahram; Gueven, Sinan; Centola, Matteo; Tsaryk, Roman et al. (2016): Spontaneous In Vivo Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells by Blocking Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. In: *Stem cells translational medicine* 5 (12), S. 1730–1738. DOI: 10.5966/sctm.2015-0321.

Martel-Pelletier, Johanne; Barr, Andrew J.; Cicuttini, Flavia M.; Conaghan, Philip G.; Cooper, Cyrus; Goldring, Mary B. et al. (2016): Osteoarthritis. In: *Nature reviews. Disease primers* 2, S. 16072. DOI: 10.1038/nrdp.2016.72.

Martinek, V.; Ueblacker, P.; Imhoff, A. B. (2003): Current concepts of gene therapy and cartilage repair. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 85 (6), S. 782–788.

McLatchie, L. M.; Fraser, N. J.; Main, M. J.; Wise, A.; Brown, J.; Thompson, N. et al. (1998): RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. In: *Nature* 393 (6683), S. 333–339. DOI: 10.1038/30666.

Merz, Denise; Liu, Ru; Johnson, Kristen; Terkeltaub, Robert (2003): IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (8), S. 4406–4415. DOI: 10.4049/jimmunol.171.8.4406.

Messlinger, K.; Hanesch, U.; Kurosawa, M.; Pawlak, M.; Schmidt, R. F. (1995): Calcitonin gene related peptide released from dural nerve fibers mediates increase of meningeal blood flow in the rat. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 73 (7), S. 1020–1024. DOI: 10.1139/y95-143.

Millet, I.; Vignery, A. (1997): The neuropeptide calcitonin gene-related peptide inhibits TNF-alpha but poorly induces IL-6 production by fetal rat osteoblasts. In: *Cytokine* 9 (12), S. 999–1007. DOI: 10.1006/cyto.1997.0245.

Millwardâ€• Sadler, S. J.; Wright, M. O.; Davies, L. W.; Nuki, G.; Salter, D. M. (2000): Mechanotransduction via integrins and interleukinâ€• 4 results in altered aggrecan and matrix metalloproteinase 3 gene expression in normal, but not osteoarthritic, human articular chondrocytes. In: *Arthritis & Rheumatism* 43 (9), S. 2091–2099. DOI: 10.1002/1529-0131(200009)43:9<2091::AID-ANR21>3.0.CO;2-C.

Mitchell, N.; Shepard, N. (1987): Effect of patellar shaving in the rabbit. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 5 (3), S. 388–392. DOI: 10.1002/jor.1100050311.

Morris, H. R.; Panico, M.; Etienne, T.; Tippins, J.; Girgis, S. I.; MacIntyre, I. (1984): Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. In: *Nature* 308 (5961), S. 746–748.

Muraglia, A.; Cancedda, R.; Quarto, R. (2000): Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. In: *Journal of cell science* 113 (Pt 7), S. 1161–1166.

Muschter, Dominique; Fleischhauer, Lutz; Taheri, Shahed; Schilling, Arndt F.; Clausen-Schaumann, Hauke; Grässel, Susanne (2020): Sensory neuropeptides are required for bone and cartilage homeostasis in a murine destabilization-induced osteoarthritis model. In: *Bone* 133, S. 115181. DOI: 10.1016/j.bone.2019.115181.

Nagao, Masashi; Hamilton, John L.; Kc, Ranjan; Berendsen, Agnes D.; Duan, Xuchen; Cheong, Chan Wook et al. (2017): Vascular Endothelial Growth Factor in Cartilage Development and Osteoarthritis. In: *Scientific Reports* 7. DOI: 10.1038/s41598-017-13417-w.

Niedermair, Tanja; Kuhn, Volker; Doranehgard, Fatemeh; Stange, Richard; Wieskotter, Britta; Beckmann, Johannes et al. (2014a): Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of endochondral ossification. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 38, S. 22–35. DOI: 10.1016/j.matbio.2014.06.007.

Niedermair, Tanja; Kuhn, Volker; Doranehgard, Fatemeh; Stange, Richard; Wieskötter, Britta; Beckmann, Johannes et al. (2014b): Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of endochondral ossification. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 38, S. 22–35. DOI: 10.1016/j.matbio.2014.06.007.

Niedermair, Tanja; Schirner, Stephan; Seebröker, Raphael; Straub, Rainer H.; Grässel, Susanne (2018): Substance P modulates bone remodeling properties of murine osteoblasts and osteoclasts. In: *Scientific Reports* 8. DOI: 10.1038/s41598-018-27432-y.

Offley, Sarah C.; Guo, Tian-Zhi; Wei, Tzuping; Clark, J. David; Vogel, Hannes; Lindsey, Derek P. et al. (2005): Capsaicin-sensitive sensory neurons contribute to the maintenance of trabecular bone integrity. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20 (2), S. 257–267. DOI: 10.1359/JBMR.041108.

Oliva, F.; Tarantino, U.; Maffulli, N. (2005): Immunohistochemical localization of calcitonin gene-related peptide and substance P in the rat knee cartilage at birth. In: *Physiological research* 54 (5), S. 549–556.

Onyekwelu, Ikemefuna; Goldring, Mary B.; Hidaka, Chisa (2009): Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration. In: *Journal of cellular biochemistry* 107 (3), S. 383–392. DOI: 10.1002/jcb.22149.

Opolka, Alfred; Straub, Rainer H.; Pasoldt, Anja; Grifka, Joachim; Grässel, Susanne (2012): Substance P and norepinephrine modulate murine chondrocyte proliferation and apoptosis. In: *Arthritis and rheumatism* 64 (3), S. 729–739. DOI: 10.1002/art.33449.

Otsuka, M.; Yoshioka, K. (1993): Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. In: *Physiological reviews* 73 (2), S. 229–308. DOI: 10.1152/physrev.1993.73.2.229.

Palazzo, Clémence; Nguyen, Christelle; Lefevre-Colau, Marie-Martine; Rannou, François; Poiraudeau, Serge (2016): Risk factors and burden of osteoarthritis. In: *Annals of physical and rehabilitation medicine* 59 (3), S. 134–138. DOI: 10.1016/j.rehab.2016.01.006.

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. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.

Pricola, Katie L.; Kuhn, Nastaran Z.; Haleem-Smith, Hana; Song, Yingjie; Tuan, Rocky S. (2009): Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. In: *Journal of cellular biochemistry* 108 (3), S. 577–588. DOI: 10.1002/jcb.22289.

Reginato, A. M.; Sanz-Rodriguez, C.; Diaz, A.; Dharmavaram, R. M.; Jimenez, S. A. (1993): Transcriptional modulation of cartilage-specific collagen gene expression by interferon gamma and tumour necrosis factor alpha in cultured human chondrocytes. In: *The Biochemical journal* 294 (Pt 3), S. 761–769. DOI: 10.1042/bj2940761.

Richardson, Stephen M.; Doyle, Paul; Minogue, Ben M.; Gnanalingham, Kanna; Hoyland, Judith A. (2009): Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral disc. In: *Arthritis research & therapy* 11 (4), R126. DOI: 10.1186/ar2793.

Rudert, M.; Wirth, C. J. (1998): Knorpelregeneration und Knorpelersatz. In: *Der Orthopade* 27 (5), W309-21. DOI: 10.1007/s001320050237.

Russell, F. A.; King, R.; Smillie, S-J; Kodji, X.; Brain, S. D. (2014): Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. In: *Physiological reviews* 94 (4), S. 1099–1142. DOI: 10.1152/physrev.00034.2013.

Sarugaser, Rahul; Lickorish, David; Baksh, Dolores; Hosseini, M. Morris; Davies, John E. (2005): Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23 (2), S. 220–229. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0166.

Schinke, Thorsten; Liese, Sarah; Priemel, Matthias; Haberland, Michael; Schilling, Arndt F.; Catala-Lehnen, Philip et al. (2004): Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19 (12), S. 2049–2056. DOI: 10.1359/JBMR.040915.

Schwab, K. E.; Hutchinson, P.; Gargett, C. E. (2008): Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 23 (4), S. 934–943. DOI: 10.1093/humrep/den051.

Schwab, W.; Bilgiçyildirim, A.; Funk, R. H. (1997): Microtopography of the autonomic nerves in the rat knee: a fluorescence microscopic study. In: *The Anatomical record* 247 (1). DOI: 10.1002/(SICI)1097-0185(199701)247:1<109::AID-AR13>3.0.CO;2-T.

Séguin, Cheryle A.; Bernier, Suzanne M. (2003): TNFalpha suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. In: *Journal of cellular physiology* 197 (3), S. 356–369. DOI: 10.1002/jcp.10371.

Shen, G. (2005): The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. In: *Orthodontics & craniofacial research* 8 (1), S. 11–17. DOI: 10.1111/j.1601-6343.2004.00308.x.

Shioda, Mikio; Muneta, Takeshi; Tsuji, Kunikazu; Mizuno, Mitsuru; Komori, Keiichiro; Koga, Hideyuki; Sekiya, Ichiro (2017): TNFα promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. In: *PloS one* 12 (5), e0177771. DOI: 10.1371/journal.pone.0177771.

Solchaga, Luis A.; Penick, Kitsie; Porter, John D.; Goldberg, Victor M.; Caplan, Arnold I.; Welter, Jean F. (2005): FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Journal of cellular physiology* 203 (2), S. 398–409. DOI: 10.1002/jcp.20238.

Spahn, Gunter (2007): Knieschmerz, Knorpelschaden und Gonarthrose: Epidemiologische, biomechanische und klinische Untersuchungen. @Jena, Univ., Habil-schr., 2008. Jena.

Tondreau, Tatiana; Meuleman, Nathalie; Delforge, Alain; Dejeneffe, Marielle; Leroy, Rita; Massy, Martine et al. (2005): Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23 (8), S. 1105–1112. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0330.

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.

Villa, I.; Dal Fiume, C.; Maestroni, A.; Rubinacci, A.; Ravasi, F.; Guidobono, F. (2003): Human osteoblast-like cell proliferation induced by calcitonin-related peptides involves PKC activity. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 284 (3), E627-33. DOI: 10.1152/ajpendo.00307.2002.

Vogt, S.; Braun, S.; Imhoff, A. B. (2007): Stadiengerechte operative Knorpeltherapie. Aktueller Stand. In: *Zeitschrift fur Rheumatologie* 66 (6), 493-503; quiz 504. DOI: 10.1007/s00393-007-0213-1.

Wakitani, S.; Goto, T.; Pineda, S. J.; Young, R. G.; Mansour, J. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M. (1994): Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 76 (4), S. 579–592. DOI: 10.2106/00004623-199404000-00013.

Waller, Craig; Hayes, David; Block, Jon E.; London, Nicholas J. (2011): Unload it: the key to the treatment of knee osteoarthritis. In: *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 19 (11), S. 1823–1829. DOI: 10.1007/s00167-011-1403-6.

Wang, L.; Zhao, R.; Shi, X.; Wei, T.; Halloran, B. P.; Clark, D. J. et al. (2009): Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity in vitro. In: *Bone* 45 (2). DOI: 10.1016/j.bone.2009.04.203.

Wehling, N.; Palmer, G. D.; Pilapil, C.; Liu, F.; Wells, J. W.; Müller, P. E. et al. (2009): Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (3), S. 801–812. DOI: 10.1002/art.24352.

Weiss, S.; Hennig, T.; Bock, R.; Steck, E.; Richter, W. (2010): Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. In: *Journal of cellular physiology* 223 (1), S. 84–93. DOI: 10.1002/jcp.22013.

Welsch, Ulrich (2010): Lehrbuch Histologie. 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.

Wu, Jianqun; Liu, Song; Wang, Zhao; Ma, Shenghui; Meng, Huan; Hu, Jijie (2018): Calcitonin gene-related peptide promotes proliferation and inhibits apoptosis in endothelial progenitor cells via inhibiting MAPK signaling. In: *Proteome science* 16, S. 18. DOI: 10.1186/s12953-018-0146-4.

Wu, Z-X; Barker, J. S.; Batchelor, T. P.; Dey, R. D. (2008): Interleukin (IL)-1 regulates ozone-enhanced tracheal smooth muscle responsiveness by increasing substance P (SP) production in intrinsic airway neurons of ferret. In: *Respiratory physiology & neurobiology* 164 (3), S. 300–311. DOI: 10.1016/j.resp.2008.07.019.

Xu, Ge; Jiang, Dianming (2014): The role and mechanism of exogenous calcitonin gene-related peptide on mesenchymal stem cell proliferation and osteogenetic formation. In: *Cell biochemistry and biophysics* 69 (2), S. 369–378. DOI: 10.1007/s12013-013-9809-z.

Yoon, Dong Suk; Lee, Kyoung-Mi; Kim, Sung-Hwan; Kim, Su Hee; Jung, Youngmee; Kim, Soo Hyun et al. (2016): Synergistic Action of IL-8 and Bone Marrow Concentrate on Cartilage Regeneration Through Upregulation of Chondrogenic Transcription Factors. In: *Tissue engineering. Part A* 22 (3-4), S. 363–374. DOI: 10.1089/ten.tea.2015.0425.

Yu, Long-Chuan; Hou, Jun-Feng; Fu, Feng-Hua; Zhang, Ying-Xin (2009): Roles of calcitonin gene-related peptide and its receptors in pain-related behavioral responses in the central nervous system. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 33 (8), S. 1185–1191. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2009.03.009.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Elisabeth Wenig
Anschrift	Schlossstraße 4
	93086 Wörth an der Donau
Telefon	0176/30693766
E-Mail	ewenig@gmx.net

Ausbildung, Studium und Praktische Weiterbildungen	
2000 bis 2004	Grundschule Rinchnach
2004 bis 2012	Gymnasium Zwiesel mit Abschluss der Allg. Hochschulreife
2012 bis 2019	Humanmedizinstudium an der Universität Regensburg mit Erlangen der Approbation als Ärztin
Juli bis September 2012	Pflegepraktium
Februar 2015	Famulatur im Fach Unfallchirurgie
März 2015	Famulatur im Fach Viszeralchirurgie
September 2015	Famulatur im Fach Kardiologie
März 2017	Famulatur im Fach Allgemeinmedizin
Praktisches Jahr: Mai bis September 2018	Innere Tertial am Lehrkrankenhaus in Bogen
Praktisches Jahr: September bis Dezember 2018	Dermatologie Tertial an der Universität in Regensburg
Praktisches Jahr: Dezember 2018 bis April 2019	Chirurgie Tertial am Lehrkrankenhaus in Memmingen

Berufsleben	
September 2019 bis dato	Assistenzärztin Innere Medizin im Krankenhaus Bogen

Weitere Qualifikationen	
12. bis 15. März 2020	Erfolgreiche Teilnahme am DEGUM zertifizierten Ultraschall- Grundkurs Abdomen, Retroperitoneum einschl. Nieren, Thorax und Schilddrüse

10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Susanne Grässel (Abteilung für Experimentelle Orthopädie am Universitätsklinikum Regensburg) für die Chance, meine Dissertation in Ihrer Abteilung zu erstellen, recht herzlich bedanken. Vielen Dank für die umfassenden fachlichen Gespräche, Rückmeldungen und Ratschläge, die mir die Strukturierung und Planung meiner Doktorarbeit möglich machten.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Joachim Grifka (Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Regenburg) für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Frau Dr. Sabine Stöckl aussprechen für ihre großartige Betreuung, ihre grenzenlose Geduld und ihr Vertrauen in mich. Ohne ihre stete Unterstützung und ihre Hilfestellungen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ich danke insbesondere den Mitarbeitern der Experimentellen Orthopädie, die mich herzlich willkommen geheißen und mich sogleich vollständig in Ihr Team integriert haben: Ich danke Frau Anja Pasoldt, Frau Claudia Göttl, Frau Mandy Vogel, Frau Dr. Tanja Niedermair, Frau Tanja Späth, Frau Dr. Dominique Muschter und Maren Hoffmann für Ihre Bereitschaft Ihr Wissen mit mir zu teilen und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Frau Dr. Ute Mayer und Johanna Reichart danke ich für die gegenseitige (und manchmal schokoladene) Unterstützung. Sehr dankbar bin ich meinem Partner Stefan, der immer an mich geglaubt hat und mich stets durch seinen großartigen und einzigartigen Humor ermutigt hat, durchzuhalten. Mein größter Dank geht an meine Eltern Johann und Elisabeth, sowie an meinen Bruder Johannes, meine Oma Maria Aigner und meine Tanten Franziska und Marianne. Ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung hat es mir ermöglicht, Ärztin zu werden.