

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik Würzburg, König-Ludwig-Haus  
Lehrstuhl für Orthopädie der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. med. Maximilian Rudert

# **Regenerative Kapazität Mesenchymaler Stammzellen bei aseptischer Prothesenlockerung**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius - Maximilians - Universität Würzburg

vorgelegt von  
Clemens Michael Braun  
aus Bielefeld

Würzburg, Oktober 2018

Referent: Prof. Dr. Maximilian Rudert  
Koreferent: Prof. Dr. Torsten Blunk  
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2020

Der Promovend ist Arzt

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet. Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht. Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe. Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt. Ich habe bis zum heutigen Tag keine akademischen Grade erworben, noch versucht solche zu erwerben.

Würzburg, 08.10.2018

Clemens Michael Braun

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die moderne Endoprothetik . . . . .	1
1.1.1	Bedeutung und Einsatz . . . . .	1
1.1.2	Komplikationen eines künstlichen Gelenkes - die (aseptische) Prothesenlockerung . . . . .	2
1.2	Mesenchymale Stammzellen . . . . .	5
1.2.1	Grundlagen . . . . .	5
1.2.2	Wachstumsverhalten und zelluläre Seneszenz . . . . .	7
1.2.3	Seneszenz-assoziiierter proinflammatorischer Phänotyp (SASP)	8
1.2.4	hMSC und aseptische Prothesenlockerungen . . . . .	8
1.3	Ziel der Arbeit . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>10</b>
2.1	Geräte . . . . .	10
2.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	11
2.3	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	12
2.4	Enzyme . . . . .	13
2.5	Kits . . . . .	13
2.6	Primer . . . . .	14
2.7	Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur . . . . .	15
2.8	Medienzusätze für die Zellkultur . . . . .	16
2.9	Puffer und Lösungen . . . . .	17
2.10	Software und Internetseiten . . . . .	18
2.11	Patientenproben . . . . .	19
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
3.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	20
3.1.1	Isolierung von hMSC . . . . .	20
3.1.2	Kultivierung von hMSC . . . . .	21
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Wachstumsrate . . . . .	22
3.1.4	In vitro Alterung von hMSC . . . . .	22
3.1.5	In vitro Differenzierung von hMSC . . . . .	22
3.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	23
3.2.1	Isolierung von zellulärer RNA . . . . .	23
3.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung . . . . .	24
3.2.3	Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptase . . . . .	24
3.2.4	Polymerase Kettenreaktion . . . . .	25
3.2.5	Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion . . . . .	26
3.2.6	Agarose Gelelektrophorese . . . . .	28
3.2.7	Densitometrie . . . . .	29
3.3	Zytochemische Methoden . . . . .	29

3.3.1	Ölrot O-Färbung . . . . .	29
3.3.2	Alizarin Rot S-Färbung . . . . .	29
3.4	Systematische Literaturrecherche . . . . .	30
3.5	Statistik . . . . .	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
4.1	Vergleich des Wachstumsverhaltens . . . . .	32
4.2	Vergleich des Seneszenzverhaltens . . . . .	34
4.2.1	Analyse des Expressionsmusters Seneszenz-assoziiierter Marker	34
4.3	Vergleich der Stammzeleigenschaften . . . . .	37
4.3.1	Analyse des Expressionsmusters Stammzell- und Seneszenz-assoziiierter Marker . . . . .	37
4.4	Vergleich der in vitro Differenzierungskapazität . . . . .	39
4.4.1	Adipogene Differenzierung . . . . .	39
4.4.2	Osteogene Differenzierung . . . . .	42
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	44
5.2	Diskussion der Methoden . . . . .	44
5.2.1	Definition des Patientenkollektivs . . . . .	44
5.2.2	Isolierung und in vitro Kultivierung/Differenzierung von hMSC	45
5.2.3	mRNA-Quantifizierung . . . . .	46
5.2.4	Differenzierungsspezifische Färbungen und deren Auswertung .	47
5.3	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	47
5.3.1	Wechspendener-hMSC besitzen tendenziell eine eingeschränkte Proliferationskapazität . . . . .	47
5.3.2	Wechspendener-hMSC besitzen eine proinflammatorische Prägung . . . . .	48
5.3.3	Langzeitkultivierung führt zur Ausbildung eines Seneszenz-assoziierten proinflammatorischen Phänotyps . . . . .	48
5.3.4	Seneszenzentwicklung hat keinen Einfluss auf den Stammzellcharakter . . . . .	49
5.3.5	Wechspendener-hMSC weisen tendenziell ein adipogenes Differenzierungsdefizit auf . . . . .	49
5.3.6	Wechspendener-hMSC weisen tendenziell ein osteogenes Differenzierungsdefizit auf . . . . .	50
5.4	Ausblick . . . . .	51
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>58</b>

<b>B</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>C</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>D</b>	<b>Formelverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>E</b>	<b>Danksagung</b>	

# 1. Einleitung

## 1.1. Die moderne Endoprothetik

### 1.1.1. Bedeutung und Einsatz

Im Jahr 2011 wurden in Deutschland mehr als 232.000 Hüft- und mehr als 168.000 Knie-Endoprothesen implantiert. Der Anteil der über 65-Jährigen lag hierbei je über 70% (Wengler et al., 2014). Hauptindikation für den Einsatz einer solchen Totalendoprothese (TEP) sind arthrotische Veränderungen an diesen beiden mechanisch stark belasteten Gelenken (Rabenberg, 2013). Die Arthrose gilt als eine der zehn invalidisierendsten Erkrankungen in entwickelten Ländern und man schätzt, dass weltweit 10% der Männer und 18% der Frauen im Alter über 60 Jahren symptomatisch erkrankt sind (OECD, 2013). Es handelt sich um eine degenerative Erkrankung des Bewegungsapparates, die den Gelenkknorpel und angrenzende Strukturen (Knochen, Muskel, Kapsel, Bänder) zerstört. Die Patienten klagen bei fortschreitendem Gelenkverschleiß über Schmerzen und Funktionseinschränkungen und sind individuell in ihrer Lebensqualität eingeschränkt (sozialer Rückzug, Gefährdung der unabhängigen Lebensführung im hohen Alter, etc.). Die Therapie besteht zunächst aus konservativen Maßnahmen (u.a. Aufklärung und Beratung, medikamentöse Schmerztherapie gemäß WHO-Stufenschema, Physiotherapie und Verwendung orthopädischer Hilfsmittel zur Progressionsverlangsamung der Gelenkzerstörung). Allerdings kann in fortgeschrittenen Stadien eine gelenkersetzende Operation indiziert sein (Rabenberg, 2013).

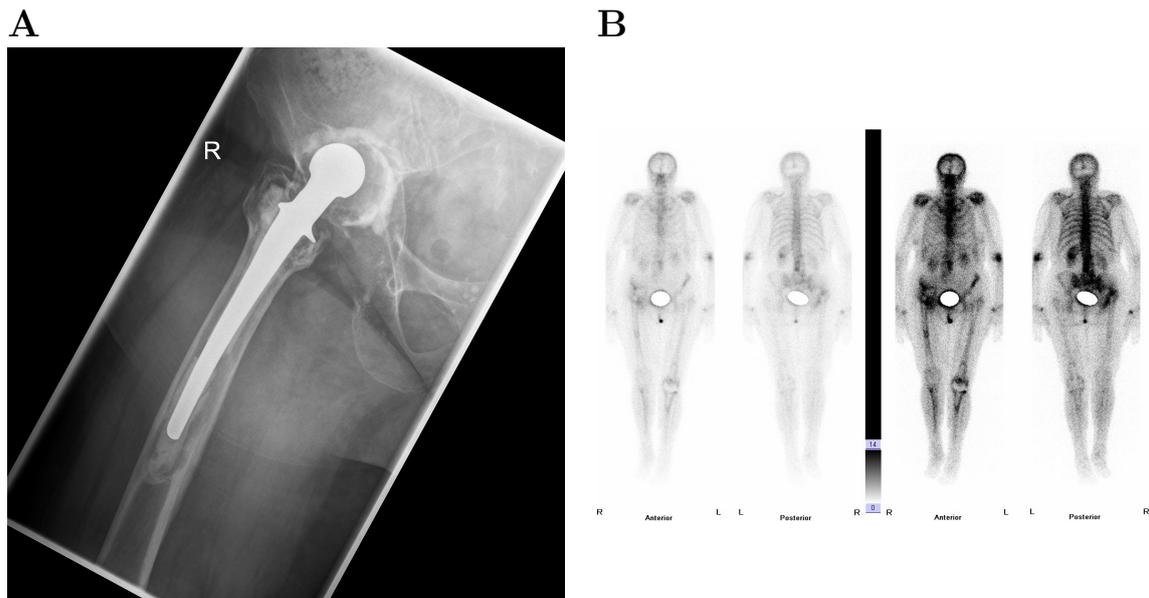
Am Beispiel der Hüftendoprothetik lässt sich exemplarisch der Erfolg des künstlichen Gelenkersatzes demonstrieren, da bei den meisten Patienten durch die Implantation einer solchen Prothese eine effektive Schmerzlinderung und Verbesserung der Funktion für mindestens 15-20 Jahre erreicht wird (Gallo et al., 2012). Die Anforderungen, die dabei von den (aktiven, gut informierten und fordernden) Patienten an den behandelnden Arzt gestellt werden, sind heutzutage besonders hoch. Eine angemessene Schmerzreduktion, postoperative Gelenk-Stabilität, geringe Infektions- und Lockerungsraten sowie ein verbessertes Überleben sind die klassischen Forderungen an den Operateur. Diese werden mittlerweile durch den Wunsch einer schnellen Erholung, eines guten kosmetischen Ergebnisses, einer hohen Funktionalität und der Anwendung der besten Technologien ergänzt (Lombardi et al., 2014). Aber auch moderne Prothesen besitzen trotz der Weiterentwicklung der Endoprothetik (z.B. auf dem Gebiet der Verankerung oder der verwendeten Materialien) eine begrenzte Haltbarkeit (Stürz, 2009).

Dies führt dazu, dass bei jüngeren Patienten und einer aktiveren Gesellschaft mit steigender Lebenserwartung die Standzeit einer Prothese nicht ausreicht und früher oder später ein Revisionseingriff notwendig wird (Gallo et al., 2012; Wirtz et al., 2008). Neben den mit einer erneuten Operation assoziierten Risiken für den Patienten sind solche Revisionseingriffe in erster Linie teuer, zeitaufwändig und die Ergebnisse sind im Vergleich zu primären Operationen schlechter (Sundfeldt et al., 2006; Wirtz et al., 2008). Daher ist die Reduktion der Revisionsrate ein wichtiges Forschungsziel, das dem Wohle des Patienten dient.

### **1.1.2. Komplikationen eines künstlichen Gelenkes - die (aseptische) Prothesenlockerung**

Neben dem allgemeinen Operationsrisiko einer Prothesen-Implantation gibt es weitere Komplikationen, die u.U. den Austausch oder die Explantation eines künstlichen Gelenkes erfordern. Einige betreffen das Material der Prothese (z.B. Prothesenbruch, Materialverschleiß des Inlays), andere hängen sekundär mit dieser zusammen (z.B. periprothetische Fraktur, Infektion, Lockerung). Bei einer Lockerung kommt es zu einem Verbindungsverlust zwischen dem Implantat und dem umgebenden Knochen bzw. Zement. Man unterscheidet hierbei zwischen einer septischen und einer aseptischen Lockerung. Führt eine bakterielle Besiedlung (z.B. durch intraoperative Keimverschleppung oder sekundär durch eine passagere Bakteriämie) zu einer Infektion des künstlichen Gelenkes, die zur Destabilisierung und Desintegration des Prothesenmaterials führt, handelt es sich um ein septisches Geschehen. Die Ätiologie einer aseptischen Lockerung hingegen ist noch immer nicht komplett verstanden: u.a. sind Abriebpartikel der Implantate (die zu einer nicht-bakteriellen Entzündungsreaktion führen), Knochenerkrankungen (z.B. Osteoporose), Art und Verankerungstechnik der Prothese (z.B. mangelnde Primärstabilität aufgrund schlechter operativer Fixierung), Fehlbelastungen und ungünstige Implantationsverhältnisse als mögliche Auslöser beschrieben (Stürz, 2009; Wirtz et al., 2008). Sowohl bei Hüft- als auch bei Knie-Endoprothesen ist die aseptische Lockerung häufigster Grund für eine Revision (Iamtanaporn et al., 2015; Lombardi et al., 2014; Narkbunnam et al., 2012; Schroer et al., 2013; Sharkey et al., 2014; Thiele et al., 2015). Die Patienten klagen beim Auftreten einer solchen aseptischen Lockerung häufig über Schmerzen im Bereich der Endoprothese (Rüttel-, Stauchungs- und/oder Rotationsschmerz) und zeigen Gangbildbe-

eintrüchtigungen (z.B. Schonhinken). Auch die Verwendung einer Gehhilfe kann ein möglicher Hinweis auf eine Lockerung sein - eine Beeinflussung durch andere Faktoren wie Alter, Allgemeinzustand und Begleiterkrankungen des Patienten sind jedoch zu beachten (Katzner et al., 2003). Solche Beschwerden und klinischen Symptome (z.B. schmerzhaft aktive und passive Beweglichkeit) sind oft uncharakteristisch und führen nicht direkt zur Diagnose (Peters et al., 2008). Der diagnostische Algorithmus bei Verdacht auf eine Prothesenlockerung umfasst neben der Anamnese (die Schmerz-anamnese ist hierbei ein unzuverlässiger Parameter zur Beurteilung eines Lockerungsstadiums) und dem klinischen Befund (s. oben) auch eine Röntgendiagnostik. Eine Lysesaubildung (linienförmige Aufhellung an der Implantat-Knochen-, Implantat-Zement- oder Zement-Knochen-Grenze) kann radiologisch nachweisbar sein und so die Verdachtsdiagnose erhärten (s. Abb. 1.1 A). Weitere radiologische Hinweise sind Osteolysen (Aufhellungen des knöchernen Lagers) und proximale Osteopenien, wobei die Demineralisation und Kortikalisausdünnung sowohl als Folge einer Lockerung als auch durch so genanntes Stress-shielding (regionale Knochendichtereduktion aufgrund der durch ein Implantat geänderten mechanischen Belastung) hervorgerufen werden können. Auch die Veränderung der Schaftposition (zunehmende Varus- oder Valgusabweichung), eine nachweisbare Pfannenmigration oder Implantatschäden (z.B. Bruch zusätzlicher Verankerungsmaterialien) können als Resultat einer Lockerung auftreten (Katzner et al., 2003). Zusätzlich kann der szintigraphische Nachweis einer Technetium-99-Anreicherung als Korrelat eines gesteigerten Knochenstoffwechsels als typisches Zeichen eines Lockerungsprozesses gewertet werden (Peters et al., 2008) (s. Abb. 1.1 B).



**Abb. 1.1:** Zur bildgebenden Diagnostik einer Prothesenlockerung kann neben einer konventionellen Röntgenaufnahme auch eine Szintigraphie zum Einsatz kommen. **A** a.p. Röntgenaufnahme eines gelockerten Prothesenkopfes rechts bei einer 80 jährigen Patientin. Gut erkennbar ist die Lyseumbildung um den Prothesenkopf. **B** Knochen-szintigramm einer gelockerten Hüft-TEP rechts. Gut erkennbar ist die vermehrte Tracer-Anreicherung im Bereich des Acetabulums. Die Verwendung der Bilder erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Professor Maximilian Rudert.

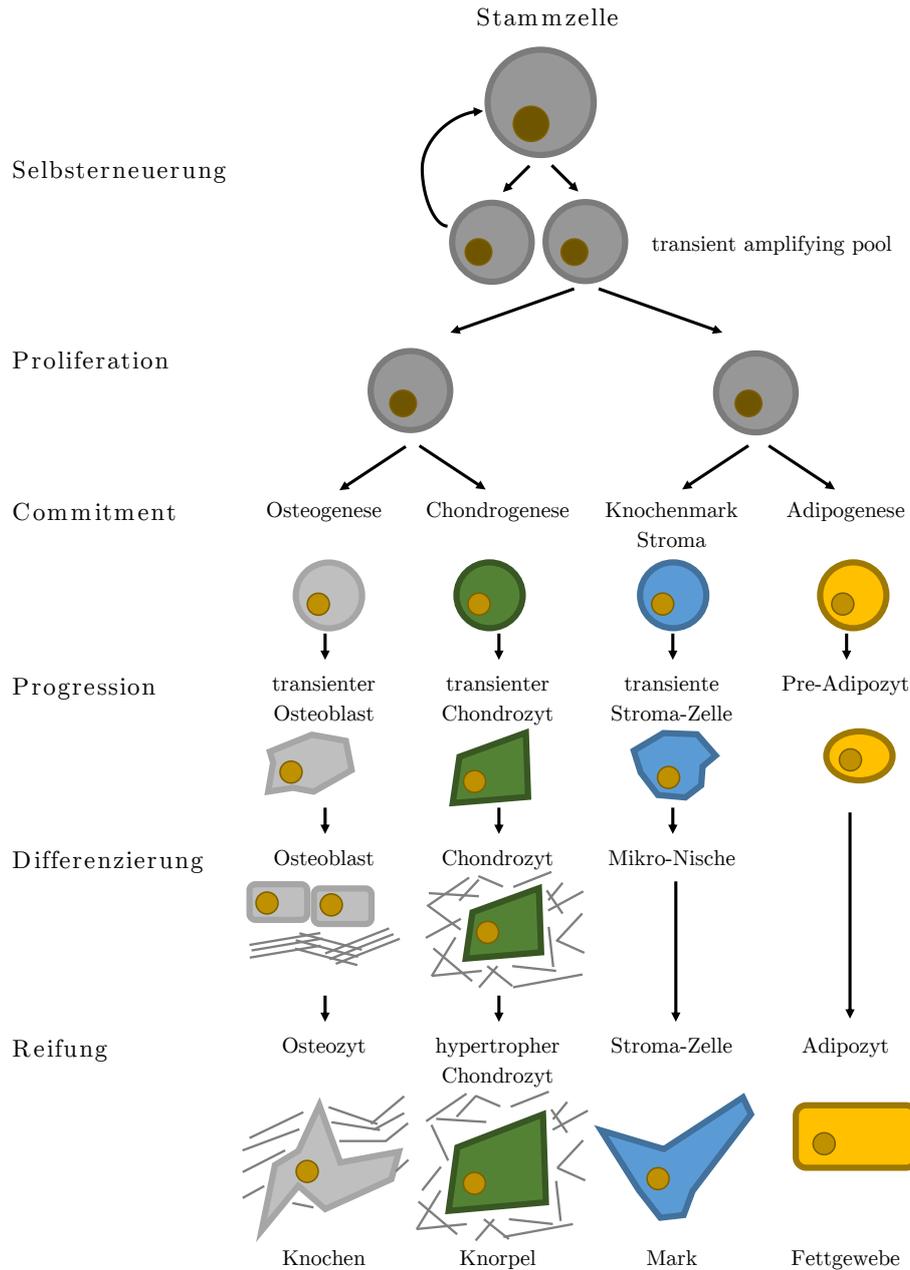
Die Unterscheidung zwischen einer septischen (erregerbedingten) und aseptischen (sterilen) Lockerung ist nach klinischen, radiologischen und laborchemischen Kriterien (z.B. BSG, Leukozyten, CRP, ggf. Gelenkpunktion) nicht immer möglich und stellt somit eine Herausforderung an den behandelnden Arzt dar. Als Komplikation einer Lockerung kann es zu einer Komponentenwanderung oder Fraktur der Prothese, des Knochenzementes oder des Knochens kommen (Peters et al., 2008). Außerdem tritt in der Regel ein kontinuierlicher Knochenverlust auf, der den Aufwand einer Revisionsoperation steigert (z.B. Verwendung größerer bzw. komplexerer Implantate nötig) (Perka et al., 2012).

## 1.2. Mesenchymale Stammzellen

Bei Mesenchymalen Stammzellen (MSC; auch als bone marrow derived stromal cells bezeichnet) handelt es sich um stromale Zellen des Knochenmarks, die Bindegewebe (Knorpel, Fett und Knochen) bilden können (Caplan, 1991) und zur Aufrechterhaltung und Regeneration dieses beitragen (Kalinina et al., 2011).

### 1.2.1. Grundlagen

Körperzellen, die in unterschiedliche Gewebe oder Zelltypen differenzieren können und ein Selbsterneuerungspotential besitzen, werden allgemein als Stammzellen bezeichnet. Sie weisen sowohl ein hohes Proliferations- als auch Differenzierungspotential auf und es sind verschiedene Arten von adulten Stammzellen (hämatopoetische, neurale, dermale, mesenchymale) bekannt (De Bari et al., 2010). Im Gegensatz zu Embryonalen Stammzellen, die in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) ausdifferenzieren können (Pluripotenz), sind MSC auf bestimmte Zelltypen beschränkt (Multipotenz). Sie kommen als nicht-hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark vor (Pittenger et al., 1999) (etwa 1 von 10.000 kernhaltigen Zellen) und bilden dort eine Nische für hämatopoetische Stammzellen, konnten aber auch aus verschiedenen anderen Geweben (z.B. Fettgewebe, Amnionflüssigkeit, Periostium, Nabelschnurblut, Bindegewebe) isoliert werden (Chamberlain et al., 2007; De Ugarte et al., 2003; Lee et al., 2004; Young et al., 1995). Als Stammzellen besitzen sie das Potential, in verschiedene Richtungen differenzieren zu können (z.B. adipogen, osteogen, chondrogen) (Jaiswal et al., 1997; Johnstone et al., 1998) und sich durch symmetrische bzw. asymmetrische Teilung selbst zu erneuern. Bei der asymmetrischen Teilung entsteht neben einer sich langsam teilenden Stammzelle zum Erhalt des Stammzellpools eine differenzierte Tochterzelle, die den transient amplifying pool als Grundlage für die weitere Expansion und Differenzierung (abhängig vom umgebenden biologischen Milieu) bildet (s. Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Übersicht über verschiedene Differenzierungswege von Mesenchymalen Stammzellen.** Als Ergebnis einer hier dargestellten asymmetrischen Teilung entsteht neben Zellen zum Erhalt des Stammzellpools eine Tochterzellengeneration, die den transient amplifying pool als Grundlage für die weitere Proliferation bildet. Die Differenzierung in verschiedenen Richtungen (z.B. osteogen, chondrogen, adipogen) ist ein stufenweiser Prozess und abhängig von unterschiedlichen Faktoren (biologisches Milieu). Nach der Festlegung eines Differenzierungsweges (Commitment) beginnt die (morphologische) Veränderung (Progression und nachfolgende Differenzierung) und endet mit der voll entwickelten Zellform der entsprechenden Reihe (Reifung). Übersetzt und modifiziert mit Erlaubnis von Springer Customer Service Centre GmbH aus (Firth et al., 2011).

In vitro können MSC nach den Kriterien der International Society for Cellular Therapy zum einen durch die Plastikadhärenz unter Standard-Kulturbedingungen, die Expression bestimmter mesenchymaler Marker (z.B. CD73, CD90 und CD105) bzw. die Abwesenheit bestimmter hämatopoetischer Marker (z.B. CD14, CD34, CD45) und das Differenzierungspotential durch Zusatz geeigneter Zellkulturmedien (osteogen, adipogen, chondrogen) charakterisiert werden (Dominici et al., 2006).

### 1.2.2. Wachstumsverhalten und zelluläre Seneszenz

Bereits vor mehr als 50 Jahren konnte mit Hilfe von in vitro Versuchen nachgewiesen werden, dass normale menschliche Zellen in Kultur eine begrenzte Kapazität zur Zellteilung besitzen (Hayflick et al., 1961). Auch MSC proliferieren nicht unbegrenzt und zeigen ein phasenhaftes Wachstumsverhalten: nach einer initialen Phase rascher Proliferation gefolgt von einer Phase langsamerer Proliferation beenden sie ihr Wachstum (Stenderup et al., 2003) nach durchschnittlich 38 (in vitro) kumulativen Populationsverdopplungen (KPD) (Bruder et al., 1997). Dieser Arrest der Zellteilung wird als Zell-Seneszenz/replikative Seneszenz bezeichnet und spiegelt einen komplexen Phänotyp wider (Sethe et al., 2006). Verschiedene Stimuli können eine solche zelluläre Seneszenz hervorrufen: u.a. sind Telomer-Verkürzungen (Harley, 1991), eine Onkogen-Aktivierung (Serrano et al., 1997), DNA-Schädigungen (Sedelnikova et al., 2004), oxidativer Stress (Chen et al., 1995) und Änderungen der Chromatinstruktur (Prieur et al., 2011) als Auslöser beschrieben. Senescente Zellen zeigen zwar weiterhin metabolische Aktivität und entziehen sich dem programmierten Zelltod (Apoptose) für eine längere Zeit (Dimri et al., 1995), unterscheiden sich aber bezüglich Morphologie (abgeflachte, vergrößerte Zellen) und biochemischer Prozesse (z.B. Hochregulation von Zell-Zyklus-Inhibitoren wie p53, p21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 und p16: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) von sich teilenden Zellen (Shay et al., 2005).

### 1.2.3. Seneszenz-assoziiertes proinflammatorisches Phänotyp (SASP)

Im Rahmen einer solchen zellulären Seneszenz kann es durch Veränderungen der Proteinexpression und -sekretion zur Ausbildung eines sog. Seneszenz-assoziierten proinflammatorischen Phänotyps (SASP: senescence-associated secretory phenotype) kommen (Coppé et al., 2010). Hierbei handelt es sich um einen komplexen Phänotyp, der Inflammations- und Tumorgenese-assoziierte Elemente beinhaltet: u.a. wurden inflammatorische und immunmodulatorische Cytokine und Chemokine (z.B. IL-6: Interleukin-6, IL-8: Interleukin-8, MCP 2: Monocyte chemoattractant protein 2), Wachstumsfaktoren (z.B. IGFs: Insulin-like growth factor-binding proteins, HGFs: Hepatocyte growth/scatter factors) und abgebaute Zelloberflächen-Moleküle (z.B. TNF-Rezeptoren: Tumor necrosis factor-Rezeptoren, ICAMs: Intracellular adhesion molecules) als Bestandteile des SASP identifiziert. Einige Komponenten des SASP verstärken den Seneszenz-assoziierten Wachstumsarrest und stimulieren Gewebereparatur und -regenerationsmechanismen (Coppé et al., 2008). Dies zeigt sich auch unter physiologischen Bedingungen der Knochenregeneration z.B. im Rahmen einer Frakturheilung. Hierbei kommt es direkt nach einem Trauma zur Ausbildung eines Hämatoms und zu einer für den Heilungsprozess notwendigen inflammatorischen Antwort. Signalmoleküle wie z.B. IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ) und IL-6 werden in diesem anfänglichen Inflamationsstadium kurzzeitig und stark reguliert sezerniert (Gerstenfeld et al., 2003). Kommt es durch Dysregulation oder Chronifizierung zu einer länger bestehenden Inflamationsreaktion, kann sich dies negativ auf den Heilungsprozess auswirken (Loi et al., 2016). Auch das längere Bestehen einer sekretorischen Aktivität im Rahmen eines SASP kann zur Unterbrechung normaler Gewebestrukturen und -funktionen führen (Coppé et al., 2008).

### 1.2.4. hMSC und aseptische Prothesenlockerungen

Aktuelle Untersuchungen von (Pajarinen et al., 2017) beleuchten die Rolle humaner MSC (hMSC) im Rahmen einer aseptischen Prothesenlockerung und beschreiben einen möglichen biologischen Mechanismus für die Entstehung von dabei auftretenden Knochendefekten: Implantatabrieb führt nach Phagozytose durch lokale Makrophagen und MSC zur Produktion von Chemokinen und proinflammatorischen Cytokinen (z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6). Diese proinflammatorischen Cytokine stimulieren die Bildung von Osteoklasten und beeinträchtigen die MSC-Funktion. Außerdem beein-

flüssen phagozytierte Abriebpartikel direkt die Lebensfähigkeit und die osteogene Differenzierungsfähigkeit von MSC negativ. Die gesteigerte Osteoklasten-Aktivität in Kombination mit der eingeschränkten Osteoblastenbildung führt durch Verschiebung des Knochenumbau-Gleichgewichts zum fortschreitenden periprothetischen Knochenverlust, der zur Lockerung führt. Insbesondere im Rahmen von dann notwendigen Revisionsoperationen erscheint somit die Hypothese plausibel, dass die Erneuerungskapazität und das osteogene Potential der lokalen MSC-Nische in starkem Maße die Reaktion eines Patienten auf einen solchen Eingriff beeinflusst (Margulies et al., 2015).

### **1.3. Ziel der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die regenerativen Eigenschaften von hMSC aus dem Knochen, die aus zwei verschiedenen Spender-Gruppen isoliert wurden, verglichen werden. Die Studien-Gruppe bildeten Patienten, die sich aufgrund einer aseptischen Prothesenlockerung einer Wechselloperation unterzogen, die Kontroll-Gruppe umfasste Patienten, denen primär eine Prothese implantiert wurde. Als Arbeitshypothesen dienten die Annahmen, dass die Wechselspender-hMSC:

schneller altern (Phänomen der Seneszenz)

eine proinflammatorische Prägung besitzen (Entwicklung eines SASP)

ein Differenzierungsdefizit aufweisen

Zur Beurteilung der regenerativen Kapazität der Zellen wurde zum einen das Alterungs- und Wachstumsverhalten in Kultur, zum anderen die in vitro Differenzierungskapazität ausgewertet (Analyse der KPD, Expressionsstärke verschiedener Marker im Verlauf der Kultivierung und Differenzierung auf mRNA-Ebene, differenzierungsspezifische Färbungen). Mit Hilfe der erhobenen Daten sollte eine Einordnung der Rolle von hMSC in der Ätiologie aseptischer Prothesenlockerungen ermöglicht werden.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

**Tab. 2.1:** Liste der verwendeten Geräte sowie deren Hersteller

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Digitalkamera	IXUS 870 IS	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland
Elektrophoresekammer	PerfectBlue Gelsystem Mini S	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Fluoreszenzsystem	Fusion SL Vilber Lourmat	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Mikropipetten	Discovery comfort 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l	HTL Labsolutions, Warschau, Polen
Mikroskop	Wilovert <sup>®</sup>	Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Tiefe: 0,100 mm; 0.0025 mm <sup>2</sup>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer	accu-jet <sup>®</sup> Pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Schüttelapparat	GFL 3015	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Spannungsgerät	Consort E835	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus LaminAir <sup>®</sup>	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Thermocycler	96 Universal peQSTAR	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
	Primus	MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
	PTC – 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
	TOptical Gradient 96	Analytik Jena AG Jena, Deutschland
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Waage	Scout II	OHAUS Corporation, Parsipanny, USA
Wasserbad	GFL 1083	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	FugeOne <sup>®</sup>	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
	Megafuge 1.0	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
	Mikro 20	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.2:** Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller

Material	Bezeichnung	Hersteller
15, 50 ml Rörchen	Cellstar <sup>™</sup> Tubes	Greiner Bio-One GmbH
	15 ml, 50 ml	Frickenhausen, Deutschland
Handschuhe	Micro-Touch <sup>®</sup>	Ansell GmbH München, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße		Greiner Bio-One GmbH
		Frickenhausen, Deutschland
Multiwellplatten	Greiner Cellstar <sup>®</sup> well plates	Greiner Bio-One GmbH
	6-Well	Frickenhausen, Deutschland
PCR Mikroreaktionsgefäße	PCR SoftTubes, farblich ge-	Biozym Scientific GmbH
	mischt	
PCR Tubes	0,2 ml	Hess. Oldendorf, Deutschland
	PCR 8er-SoftStrips, farblos	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen	0,2 ml	Hess. Oldendorf, Deutschland
	Pipet Tips	Axygen Scientific
Pipettenspitzen mit Filter	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Union City, USA
	SafeSeal-Tips <sup>®</sup> professional	Biozym Scientific GmbH
qPCR Verschlussstreifen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Hess. Oldendorf, Deutschland
	Flat Caps Strips, farblos	Biozym Scientific GmbH
qPCR Tubes		Hess. Oldendorf, Deutschland
	Low Profile 8-er Strips, weiß	Biozym Scientific GmbH
	0,2 ml	Hess. Oldendorf, Deutschland

Material	Bezeichnung	Hersteller
UV-Küvette		Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen	Nunc™ EasYFlask™ 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG Braunschweig, Deutschland
	Cellstar® Cell Culture Flasks 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Cell Scraper	SPL Life Sciences Co., Ltd. Eumhyeon-ri, Korea

## 2.3. Chemikalien und Reagenzien

**Tab. 2.3:** Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
100 bp DNA Ladder	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
1 kb DNA Ladder	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
5x GoTaq® Flexi Puffer	Promega, Madison, USA
Agarose	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Ammoniak, 25%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aqua bidest	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ascorbat-2-Phosphat, ≥95%	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Borsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Chlorwasserstoff (Salzsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat, ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
dNTP-Set (dCTP, dGTP, dATP, dTTP)	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ethanol, ≥99,9%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
GelRed <sup>®</sup> 10000x	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
HPLC Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Indomethacin	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Kaliumchlorid, $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
M-MLV-Puffer RT 5x Buffer	Promega, Madison, USA
Magnesiumchlorid, 25 mM	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Oilred O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oligo-(dt)Primer	Promega, Mannheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

## 2.4. Enzyme

Tab. 2.4: Liste der verwendeten Enzyme sowie deren Hersteller

Enzym	Bezeichnung	Hersteller
DNA Polymerase	GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, $5 \frac{U}{\mu l}$	Promega, Mannheim, Deutschland
	GoTaq <sup>®</sup> qPCR Master Mix 2x	Promega, Mannheim, Deutschland
reverse Transkriptase	M-MLV Reverse Transcriptase, $200 \frac{U}{\mu l}$	Promega, Mannheim, Deutschland
Trypsin-EDTA	Trypsin-EDTA 1X	Gibco <sup>®</sup> by Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

## 2.5. Kits

Tab. 2.5: Liste der verwendeten Kits sowie deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

## 2.6. Primer

Mit Ausnahme der COX4I1- und IL-1 $\beta$ -Primer wurden alle weiteren Primer von der Firma biomers.net GmbH in Ulm, Deutschland bezogen. Die Ausnahmen wurden von der Firma Qiagen GmbH in Hilden, Deutschland bezogen.

**Tab. 2.6:** Liste der verwendeten PCR Primer, deren Genbank Accessionnummer, deren Sequenz, die Größe des Produktes in bp und die Parameter der PCR (Zyklusanzahl, Annealing Temperatur  $T_A$  in °C, Konzentration von MgCl<sub>2</sub> in mM)

Primer	Genbank Accessionnr.	Sequenz 5' - 3'	Produkt- größe [bp]	Zyklen	$T_A$ [°C]	MgCl <sub>2</sub> [mM]
ALP for	NM_000478.4	TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA	483	35	55	1,5
ALP rev		ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC				
EEF1A1 for	NM_001402.5	CTGTATTGGATTGCCACACG	368	19	60	2,5
EEF1A1 rev		AGACCGTTCTTCCACCACTG				
FABP4 for	NM_001442.2	AACCTTAGATGGGGGTGTCC	177	28	60	1,0
FABP4 rev		ATGCGAACTTCAGTCCAGGT				
LPL for	NM_000237.2	GAGATTTCTCTGTATGGCACC	276	32	55	1,0
LPL rev		CTGCAAATGAGACACTTTCTC				
OC for	NM_199173.4	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	293	33	62	1,0
OC rev		GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC				
Oct4 for	NM_002701.5	TTTTGGTACCCAGGCTATG	134	35	60	2,0
Oct4 rev		AGGCACCTCAGTTTGAATGC				
OP for	NM_001040058.1	ACCCTTCCAAGTAAGTCCAA	400	32	58	1,0
OP rev		GTGATGTCTCTGTCTGTAGC				
p16 for	NM_000077.4	GGTGCGGGCGCTGCTGGA	209	35	60	1,5
p16 rev		AGCACCACCAGCGTGTCC				
PPAR $\gamma$ 2 for	NM_015869.4	GCTGTTATGGGTGAAACTCTG	352	33	61	1,5
PPAR $\gamma$ 2 rev		ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC				
PSG5 for	NM_002781.3	TACAAAGGACAACCTGATGGACC	540	35	59	2,0
PSG5 rev		CTGGGGAGGTCTGGACCAT				

**Tab. 2.7:** Liste der verwendeten qPCR Primer, deren Genbank Accessionnummer, deren Sequenz, die Größe des Produktes in bp und die Parameter der qPCR (Zyklusanzahl, Annealing Temperatur  $T_A$  in °C)

Primer	Genbank Accessionnr.	Sequenz 5' - 3'	Produktgröße [bp]	Zyklen	$T_A$ [°C]
COX4I1	NM_001861	Qiagen Sequenz		40	60
IL-1 $\beta$	NM_000576	Qiagen Sequenz		40	60
IL-6 qfor	NM_000600	AAAGCAGCAAAGAGGCACTG	108	40	60
IL-6 qrev		TTTTTCACCAGGCAAGTCTCC			
IL-8 qfor	BT007067	CATACTCCAAACCTTTCCAC	165	40	60
IL-8 qrev		TCAAAAACCTTCTCCACAACC			
RPS27A qfor	NM_001135592	TCGTGGTGGTGCTAAGAAAA	141	40	60
RPS27A qrev		TCTCGACGAAGGCGACTAAT			
SAA1 qfor	M23699	GCAAAGACCCCAATCACTTC	127	40	57
SAA1 qrev		GTACCCTCTCCCCGCTTTG			
SAA2 qfor	AB937783	CGATCAGGCTGCCAATAAAT	124	40	60
SAA2 qrev		GCCTCATAGCCAGGTCTCCT			

## 2.7. Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur

**Tab. 2.8:** Liste der verwendeten Nährmedien sowie deren Zusammensetzung für die Zellkultur

Medium	Menge	Bestandteil
MSC-Zellkulturmedium	500 ml	DMEM/HAM's F12 mit Glutamin
	10 %	FCS (fetal calf serum)
	1 $\frac{U}{ml}$	Penicillin
	100 $\frac{g}{ml}$	Streptomycin
	50 $\frac{\mu g}{ml}$	Ascorbat-2-Phosphat
Adipogenes Differenzierungsmedium	500 ml	DMEM High Glucose (4,5 $\frac{g}{l}$ )
	10 %	FCS (fetal calf serum)
	1 $\frac{U}{ml}$	Penicillin
	100 $\frac{g}{ml}$	Streptomycin
	1 $\mu M$	Dexamethason
	500 $\mu M$	3-Isobutyl-1-methylxanthin
	1 $\frac{\mu g}{ml}$	Insulin
	100 $\mu M$	Indomethacin

Medium	Menge	Bestandteil
Osteogenes Differenzierungsmedium	500 ml	DMEM High Glucose (4,5 $\frac{g}{l}$ )
	10 %	FCS (fetal calf serum)
	1 $\frac{U}{ml}$	Penicillin
	100 $\frac{g}{ml}$	Streptomycin
	50 $\frac{\mu g}{ml}$	Ascorbat-2-Phosphat
	10 mM	$\beta$ -Glycerophosphat
	100 nM	Dexamethason

## 2.8. Medienzusätze für die Zellkultur

**Tab. 2.9:** Liste der verwendeten Medienzusätze sowie deren Zusammensetzung/Hersteller für die Zellkultur

Medienzusatz	Menge	Bestandteil/Hersteller
3-Isobutyl-1-methylxanthin (500 mM)	0,5555 g	3-Isobutyl-1-methylxanthin
	5 ml	Dimethylsulfoxid
Ascorbat-2-Phosphat (50 $\frac{mg}{ml}$ )	2,5 g	Ascorbat-2-Phosphat Salz
	ad 50 ml	Aqua bidest
$\beta$ -Glycerophosphat (1 M)	2,16 g	$\beta$ -Glycerophosphat
	10 ml	Aqua bidest
Dexamethason (1 mM)	0,00393 g	Dexamethason
	10 ml	Ethanol
DMEM High Glucose (4,5 $\frac{g}{l}$ )		Gibco <sup>®</sup> by Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
DMEM/HAM's F12 mit Glutamin		Gibco <sup>®</sup> by Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
FCS (fetal calf serum)		Biochrom GmbH, Berlin Deutschland
Indomethacin (100 mM)	0,03578 g	Indomethacin
	1 ml	Dimethylsulfoxid

Medienzusatz	Menge	Bestandteil/Hersteller
Insulin ( $10 \frac{mg}{ml}$ )		Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Penicillin-Streptomycin ( $10.000 \frac{U}{ml}$ )		Gibco <sup>®</sup> by Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

## 2.9. Puffer und Lösungen

Je nach benötigter Reinheit wurden Puffer und Lösungen mit deionisiertem Wasser, destilliertem und deionisiertem Wasser (Aqua bidest) oder mit HPLC-Wasser angesetzt.

**Tab. 2.10:** Liste der verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung

Puffer/Lösung	Menge/Konzentration	Bestandteil
Alizarin Rot S-Färbelösung	1 g (1%)	Alizarin Red S
	1 ml (0,25%)	Ammoniak, 25%
	ad 100 ml	destilliertes Wasser
dNTP-Lösung	10 $\mu$ l (20 mM)	dATP, 100 mM
	10 $\mu$ l (20 mM)	dGTP, 100 mM
	10 $\mu$ l (20 mM)	dCTP, 100 mM
	10 $\mu$ l (20 mM)	dTTP, 100 mM
	ad 50 $\mu$ l	HPLC-Wasser
Ölrot O-Färbelösung	0,5 g (0,5%)	Oilred O
	ad 100 ml	2-Propanol
Paraformaldehyd-Lösung (4%, pH 7,4)	4 g (4%)	Paraformaldehyd
	100 - 150 $\mu$ l	NaOH
	ad pH 7,4	HCl
	ad 100 ml	PBS
PBS (pH 7,4)	8,00 g (137 mM)	NaCl
	0,20 g (2,7 mM)	KCl
	1,44 g (10 mM)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,24 g (1,8 mM)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad pH 7,4	HCl
	ad 1 l	Aqua bidest
TBE Puffer 10 x	108 g (0,89 M)	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	55 g (0,89 M)	Borsäure
	40 ml (0,2 M)	EDTA 0,5 M (pH 8,0)
	ad 1 l	Aqua bidest

Puffer/Lösung	Menge/Konzentration	Bestandteil
Tris-Lösung (10 mM, pH 7,5)	10 mM 1 mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan EDTA
Trypanblau	0,20 ml (0,4%) 0,45 ml (0,9%) ad 50 ml	Trypanblau NaCl Aqua bidest

## 2.10. Software und Internetseiten

**Tab. 2.11:** Liste der verwendeten Software und Internetseiten

Name	
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
EndNote X7.8	Thomson Reuters, New York, USA
FusionCapt Advance SL2 Xpress	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
GeneCards <sup>®</sup>	<a href="http://www.genecards.org/">http://www.genecards.org/</a>
ImageJ 1.48v	Wayne Rasband
Microsoft <sup>®</sup> Excel <sup>®</sup> 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NCBI Blast <sup>®</sup>	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
qPCRsoft 3.1	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
REST 2009 V2.0.13	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Tex Maker 4.4.1	©2003-2014: Pascal Brachet

## 2.11. Patientenproben

**Tab. 2.12:** Liste der verwendeten Patientenproben mit Gruppenzugehörigkeit, Alter und Geschlecht (m.: männlich; w.: weiblich)

Probenbezeichnung	Gruppenzugehörigkeit	Alter [Jahre]	Geschlecht
MSC 1061	Wechselgruppe	53	w.
MSC 1070	Wechselgruppe	73	w.
MSC 1131	Kontrollgruppe	64	w.
MSC 1132	Kontrollgruppe	47	m.
MSC 1133	Wechselgruppe	87	m.
MSC 1134	Wechselgruppe	67	w.
MSC 1135	Wechselgruppe	62	w.
MSC 1138	Wechselgruppe	71	m.
MSC 1140	Kontrollgruppe	60	w.
MSC 1148	Kontrollgruppe	80	m.
MSC 1149	Kontrollgruppe	68	m.
MSC 1153	Wechselgruppe	55	w.
MSC 1155	Kontrollgruppe	45	m.
MSC 1157	Kontrollgruppe	68	m.
MSC 1160	Wechselgruppe	81	w.

## 3. Methoden

### 3.1. Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1. Isolierung von hMSC

Die Isolation der hMSC fand im König-Ludwig-Haus in Würzburg statt. Die formale Zustimmung der lokalen Ethikkommission der Universität Würzburg (AZ 100/14) für den Umgang mit den gewonnenen Stammzellen beinhaltete die informierte Einverständnis der Patienten. Die Proben der Kontrollgruppe stammten von Patienten, die primär mit einer Prothese (Knie- oder Hüftprothese) versorgt wurden. Patienten, die sich einer Knie- oder Hüft-Wechseloperation aufgrund einer Implantatlockerung unterzogen und weder klinische noch laborchemische Zeichen einer Infektion aufwiesen, wurden nach weiterer Einschätzung durch den Operateur in die aseptische Wechselgruppe aufgenommen. Die Spender waren zwischen 45 und 87 Jahren alt, im Durchschnitt 65,4 Jahre (s. Tab. 2.12). Die während einer Operation gesammelten Proben (z.B. Spongiosa aus der Hüftpfanne, der Metaphyse oder dem Hüftkopf) wurden im Operationssaal verpackt, im Labor anonymisiert und anschließend weiterverarbeitet. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einem Labor der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Zum Ausschluss einer Hepatitis- oder HIV-Infektion wurden von sämtlichen Spendern Serumproben zur virologischen Untersuchung in ein externes Labor versandt. Zunächst wurde die Probenverpackung unter der Sterilwerkbank geöffnet und mit einem Löffel oder einer Pinzette die Spongiosa ausgeschabt bzw. gewonnen. Diese wurde dann auf zwei 50 ml-Röhrchen aufgeteilt und mit je etwa 25-30 ml (zusatzfreiem) DMEM/Ham's F12 Medium (im Wasserbad auf 37 °C erwärmt) aufgefüllt. Danach wurde das Gemisch manuell geschüttelt und anschließend 5 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Der dadurch gebildete (fettreiche) Überstand wurde mit einer Plastikpipette vorsichtig abgesaugt. Um die Zellen nach diesem ersten Reinigungsschritt aus dem Gewebe auszuschwemmen und zu isolieren, wurden folgende Schritte zwei- bis dreimal wiederholt, bis die Spongiosa nicht mehr rot sondern weisslich und damit zellenarm erschien: Je etwa 25-30 ml erwärmtes DMEM/Ham's F12 Medium wurden hinzugefügt und per Hand kräftig geschüttelt. Nach der Sedimentation der Knochen- und Bindegewebsreste wurde der zellreiche Überstand in je ein separates 50 ml-Röhrchen transferiert. Die so gesammelten Zellsuspensionen wurde dann für 5 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt. Die in den beiden 50 ml-Röhrchen gebildeten Zellpellets wurden in insgesamt 40 ml MSC-Zellkulturmedium vereinigt, resuspendiert und eine Zellzählung durchgeführt (s. 3.1.3).  $1 \times 10^9$  Zellen wurden dann in einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät und mit MSC-Zellkulturmedium auf 27 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die so erhaltenen Zellkulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 3-4 Tagen wurden sie mit sterilem PBS gewaschen (Entfernung von Knochenresten, etc.) und mit neuem MSC-Zellkulturmedium versorgt. Regelmäßig (alle 3-4 Tage) wurde ab diesem Zeitpunkt das Medium gewechselt bis sich (Sub-)Konfluenz einstellte (nach ca. 1-2 Wochen) und die Zellen zum ersten Mal passagiert werden konnten.

### 3.1.2. Kultivierung von hMSC

Die hMSC wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Pro Präparation wurden mindestens 2 Zellkulturflaschen verwendet: die eine diente dem Stammerhalt und der Gewinnung von Zellen für die unterschiedlichen Versuche (s. unten), die andere der RNA Gewinnung (s. 3.2.1). Sämtliche Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen (Handschuhe, Sterilwerkbank) durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Regelmäßig (alle 3-4 Tage) wurde das verbrauchte MSC-Zellkulturmedium zunächst mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und anschließend durch im Wasserbad auf 37 °C erwärmtes MSC-Zellkulturmedium ersetzt (15 ml). Sobald sich mikroskopisch ein (sub-)konfluentes Zellbild ergab (80-90%) wurden die Zellen passagiert und gesplittet. Hierzu wurde zunächst das MSC-Zellkulturmedium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS bedeckt. Dies diente der Wegwaschung von im Zellmedium enthaltenem Antitrypsin, das den darauffolgenden Verdauungsschritt verhindert hätte. Nach dem erneuten Absaugen wurde 1 ml Trypsin/EDTA auf den Zellrasen gegeben und die Zellkulturflasche für etwa 5 Minuten in den Brutschrank zurückgestellt. Dies diente dem Ablösen der Zellen von der Plastikoberfläche und konnte nach der Inkubation optisch unter der Sterilwerkbank (Schleierbildung durch den Haftverlust des Zellrasen) oder mikroskopisch (Abrundung der Zellen) kontrolliert werden. Durch Zugabe von 9 ml MSC-Zellkulturmedium konnte die enzymatische Reaktion gestoppt und die Zellen vom Flaschenboden gelöst werden. Die so erhaltene Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der verbleibende Überstand abgesaugt. Das Zellpellet am Boden des 50 ml-Röhrchens wurde danach mit einem definierten Volumen MSC-Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert und die Zellen gezählt (s. 3.1.3). Abhängig von den geplanten Experimenten wurden anschließend festgelegte Zellmengen auf verschiedene Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>) oder Mikrotiterplatten (6-Well) verteilt (s. Tab. 3.1).

**Tab. 3.1:** Liste der verwendeten Kulturmaterialien und ausgesäten Zellzahlen nach Versuchen

Versuch	Kulturmaterial	Menge	Zellzahl
Stammerhalt	75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche		3,75 x 10 <sup>5</sup>
RNA-Gewinnung	75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche		3,75 x 10 <sup>5</sup>
Differenzierung Kontrolle (RNA)	25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche		5,00 x 10 <sup>5</sup>
Differenzierung osteogen (RNA)	25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche		5,00 x 10 <sup>5</sup>
Differenzierung adipogen (RNA)	25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche		5,00 x 10 <sup>5</sup>
Differenzierung (Färbung)	6-Well-Platte	4 Wells	je 2,00 x 10 <sup>5</sup>

### 3.1.3. Bestimmung der Zellzahl und Wachstumsrate

Die Zählung der Zellen diente als Grundlage, um die verschiedenen Zellchargen mit gleichen Zellzahlen zu passagieren bzw. auszusäen und so eine Vergleichbarkeit der Kulturen zu gewährleisten. Ein Tropfen der nach der Zentrifugation in einem definierten Volumen resuspendierten Zellen wurde für die Zellzahlbestimmung benötigt und in ein separates Mikroreaktionsgefäß pipettiert. 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurde dann mit 40  $\mu\text{l}$  PBS und 50  $\mu\text{l}$  Trypanblau vermischt und mit Hilfe einer Pipette in die Neubauer Zählkammer eingebracht. Trypanblau diente durch Färbung perforierter bzw. toter Zellen der Unterscheidung und erlaubte es so, nur die lebenden Zellen zu zählen. Die Zählkammer selbst bestand aus vier Großquadraten, die in je 16 Quadrate unterteilt waren. Die gezählte Anzahl aller Großquadrate wurde gemittelt, mit dem Kammerfaktor  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert und so die Zellzahl pro ml ermittelt. Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens wurde bei jeder Passage die Populationsverdopplung  $PD$  nach folgender Formel berechnet:

$$PD = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2} \quad (1)$$

wobei  $N_1$  die geerntete Zellzahl und  $N_0$  die ausgesäte Zellzahl repräsentierte. Durch Addition der bei jeder Passage bestimmten  $PD$  ergab sich die KPD, die als Funktion der Zeit in Kultur betrachtet wurde. Da erst in Passage P1 (nach artifizierter Selektion durch die Kulturbedingungen) die Aussaat ausschließlich von hMSC in einer definierten Zellzahl möglich war, konnte die KPD erst ab Passage P2 bestimmt werden (Cristofalo et al., 1998).

### 3.1.4. In vitro Alterung von hMSC

Für die in vitro Alterung wurden die hMSC ab Passage P1 bis zur seneszenten Passage Ps kultiviert. Diese finale Passage war dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen innerhalb von drei Wochen keine Konfluenz erreichten (Wachstumsarrest) und morphologische Veränderungen aufwiesen (z.B. Abflachung und Verbreiterung).

### 3.1.5. In vitro Differenzierung von hMSC

Zur Bewertung des Stammzellpotentials der hMSC wurde eine in vitro Differenzierung durchgeführt. Hierzu wurden bei Passage P1 oder P2 einer Zellkultur  $1,5 \times 10^6$  Zellen auf drei  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen verteilt. Diese wurden dann mit MSC-Zellkulturmedium versorgt und inkubiert. Sobald sich ein (sub-)konfluentes Zellbild einstellte, wurde das MSC-Zellkulturmedium abgesaugt und durch je eines der Differenzierungsmedien (adipogenes Differenzierungsmedium, osteogenes Differenzierungsmedium; s. 2.7) bzw. durch MSC-Zellkulturmedium (die so versorgten Zellen differenzierten nicht und dienten als Kontrolle) ersetzt. Anschließend wurden die Zellkulturen bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  für 14 Tage inkubiert. Alle 3-4 Tage wurde das entsprechende Medium gewechselt und am Ende der Differenzierungsphase die RNA isoliert (s. 3.2.1). Außerdem wurden für Färbungen (s. 3.3) je  $2 \times 10^5$  Zellen auf vier Wells einer 6er-Mikrotiterplatte ausgesät. Auch diese Zellen wurden zunächst

mit MSC-Zellkulturmedium versorgt (3 ml pro Well) und bei Einstellung eines (sub-)konfluenten Zellbildes auf je eines der Differenzierungsmedien umgestellt. Regelmäßig wurde das entsprechende Medium gewechselt und am Ende der Differenzierungsphase (adipogen: 3 Wochen; osteogen: 4 Wochen) die entsprechende Färbung durchgeführt (undifferenzierte Zellen dienten hierbei als Kontrollen). Aufgrund der Flächenverhältnisse der Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) und der einzelnen Wells (9,6 cm<sup>2</sup>) wurde mit den so ausgesäten Zellzahlen eine nahezu identische Zellzahl pro Fläche erreicht (etwa  $2 \times 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ ) und dadurch Vergleichbarkeit hergestellt.

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Isolierung von zellulärer RNA

Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Kits von Machery-Nagel gemäß der Gebrauchsanweisung umgesetzt. Um Kontaminationen mit Nukleasen zu vermeiden, wurden stets Handschuhe getragen und sterile Mikroreaktionsgefäße verwendet. Zur Gewinnung des Probenmaterials wurde das MSC-Zellkulturmedium zunächst sorgfältig aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Um die Zellen zu lysieren, wurden im nächsten Schritt 350 µl RA1 Puffer und 3,5 µl β-Meracaptoethanol in einem separaten Mikroreaktionsgefäß gemischt und gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilt. Mit Hilfe eines Zellschabers konnte dann mechanisch der Zellrasen abgelöst und in ein neues Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) pipettiert werden. Um die Viskosität des gewonnenen Lysats zu reduzieren, wurde es anschließend auf einen im Kit enthaltenen Filter aufgebracht und durch Zentrifugation (1 Minute bei 11000 x g) in ein neues Sammelgefäß gepresst. Der Filter wurde danach verworfen und 350 µl 70% Ethanol zu dem filtrierten Lysat hinzugegeben. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurde das Lysat homogenisiert und danach auf eine im Kit enthaltene Säule (die bereits in einem sterilen Sammelgefäß stand) aufgebracht. Die darauf folgende Zentrifugation (30 Sekunden bei 11000 x g) diente dazu, die in der Probe enthaltene RNA an die Membran der Säule zu binden. Um die Effektivität des darauffolgenden DNA-Verdaus zu steigern, wurden im nächsten Schritt 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) zur Entsalzung der Säulenmembran auf diese aufgebracht. Durch erneute Zentrifugation (1 Minute bei 11000 x g) wurde die Membran dann getrocknet. Um mögliche Verunreinigungen durch genomische DNA zu reduzieren, wurden sodann 95 µl DNase Reaktions Mix (bestehend aus 90 µl Reaction Buffer for rDNase und 10 µl rekombinanter DNase (rDNase)) aufgebracht und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch wurde noch vorhandene DNA verdaut. Die folgenden Waschschritte mit RAW2 und RA3 Puffer dienen der Inaktivierung der rDNase und trockneten die Säulenmembran. Anschließend konnte die RNA mit Hilfe von 60 µl RNase-freiem Wasser in ein Mikroreaktionsgefäß eluiert werden. Die so gewonnen RNA wurde bei -20 °C tiefgefroren und gelagert.

### 3.2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nach der RNA Isolation (s. 3.2.1) wurde die RNA-Konzentration der Proben mit Hilfe eines Photometers optisch ermittelt. Je 2  $\mu\text{l}$  Probenmaterial wurden mit 48  $\mu\text{l}$  Tris-Lösung in eine Küvette gegeben und die Extinktion E bei einer Wellenlänge von 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Diese Wellenlängen dienten aufgrund der Absorptionscharakteristika von Nukleinsäuren und Proteinen zur Bestimmung des Grades der Verunreinigung. Als Nullwert/Referenzwert diente eine RNA-freie Tris-Lösung. Das Gerät berechnete aus den ermittelten Extinktionswerten die RNA Konzentration und den Quotienten  $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ . Dieser galt als Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,6 und 2,4 liegen.

### 3.2.3. Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptase

Um die Transkription der verschiedenen ausgewählten Gene zu untersuchen, wurde zuerst die in einer Probe enthaltene RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Bei sämtliche Arbeitsschritten wurden Handschuhe und Filterpipettenspitzen verwendet, um Kontaminationen mit Fremdmaterial und Nukleasen zu vermeiden. Zunächst wurde 1  $\mu\text{g}$  RNA (das zu pipettierende Volumen V ergab sich gemäß der Beziehung  $V = \frac{m}{c_{RNA}}$  aus der photometrisch gemessenen RNA Konzentration  $c_{RNA}$ ) in einem PCR-Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und mit HPLC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 16  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Anschließend wurden 2  $\mu\text{l}$  Oligo-dT-Primer-Lösung (25  $\frac{\mu\text{M}}{\mu\text{l}}$ ) hinzugegeben. Die enthaltenen Oligo-dT-Primer waren komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA und ermöglichten beim späteren Schritt der reversen Transkription (RT) die Anlagerung des Enzyms an diese. Die gesamte Lösung wurde danach für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und folgender Reaktionsmix vorgelegt:

**Tab. 3.2:** Reaktionsmix für die RT

Menge	Zusatz
5,000 $\mu\text{l}$	M-MLV RT 5x Puffer
0,625 $\mu\text{l}$	dNTP-Lösung (je 20 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP)
1,000 $\mu\text{l}$	M-MLV Reverse Transcriptase (200 $\frac{U}{\mu\text{l}}$ )
0,375 $\mu\text{l}$	HPLC-Wasser

Nach der Inkubation wurden die 7  $\mu\text{l}$  Reaktionsmix zu der Probe gegeben, das Mikroreaktionsgefäß kurz anzentrifugiert und danach für 1 h bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Zuletzt folgte eine finale Erhitzung für 10 min auf 95 °C, um die Reaktion zu beenden. Jede Probe wurde im Anschluss mit 25  $\mu\text{l}$  HPLC-Wasser vermischt und die so gewonnene (1:1 verdünnte) Probe mit einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  eingefroren.

### 3.2.4. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen, die anhand der verwendeten Primer festgelegt wird. Bei sämtlichen Arbeitsschritten wurden Handschuhe, Filterpipettenspitzen und sterile PCR Gefäße verwendet, um Kontaminationen mit Fremdmaterial und Nukleasen zu vermeiden. Negativkontrollen (s. unten) dienten der Objektivierung von Verunreinigungen im PCR-Mix. Außerdem wurden sämtliche Lösungen und Proben auf Eis gelagert. Folgender PCR-Mix wurde gemäß den Primerspezifikationen bzgl.  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration (s. 2.6) in einem separaten Mikroreaktionsgefäß vorgelegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die DNA Polymerase zuletzt hinzugefügt wurde, um enzymatische Reaktionen vor der geplanten PCR zu reduzieren.

**Tab. 3.3:** Reaktionsmix für die PCR

Menge	Zusatz
10,0 $\mu\text{l}$	Green GoTaq <sup>®</sup> Flexi Puffer
0,2 $\mu\text{l}$	Taq Polymerase ( $5 \frac{\text{U}}{\mu\text{l}}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	dNTP-Lösung (je 20 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP)
0,5 $\mu\text{l}$	Primer for (50 $\mu\text{M}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	Primer rev (50 $\mu\text{M}$ )
variabel $\mu\text{l}$	$\text{MgCl}_2$
ad 48,0 $\mu\text{l}$	HPLC-Wasser

48  $\mu\text{l}$  PCR-Mix wurden anschließend in einem PCR-Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und 2  $\mu\text{l}$  cDNA Probe (1:1 verdünnt) hinzugefügt (bei der Negativkontrolle wurden stattdessen 2  $\mu\text{l}$  HPLC-Wasser hinzugefügt). Nach kurzem Anzentrifugieren wurde die Probe in der PCR-Maschine folgendem primerspezifischen (zyklischen) Temperaturverlauf ausgesetzt:

**Tab. 3.4:** Bedingungen für die PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	1
Denaturierung	94 °C	30 sek	} s. 2.6
Annealing	60 °C	30 sek	
Elongation	72 °C	30 sek	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Termination	12 °C	$\infty$	1

Während der Denaturierungsphase wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. In der darauffolgenden Annealingphase lagern sich die ausgewählten Primer an die komplementären Sequenzen der DNA und können im nächsten Schritt (Elongation) als Startpunkte für die thermostabile Polymerase dienen. Dieser Reaktionszyklus wird mehrmals durchlaufen und erlaubt die exponentielle Amplifikation des untersuchten DNA-Abschnitts.

### 3.2.5. Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion (qPCR) dient (basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, s. 3.2.4) der Amplifikation und Quantifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten. Hierbei werden die während eines Reaktionszyklus entstehenden fluoreszierenden qPCR-Produkte am Ende eines solchen detektiert. Die so erhaltenen Fluoreszenz-Signale können nach Abschluss der Reaktionszyklen (s. Tab. 3.7) zur Quantifizierung der exponentiellen Phase (nur wenige Zyklen dauernde Phase die durch optimale Reaktionsbedingungen gekennzeichnet ist) verwendet werden. Bei sämtlichen Arbeitsschritten wurden Handschuhe, Filterpipettenspitzen und sterile qPCR Gefäße verwendet, um Kontaminationen mit Fremdmaterial und Nukleasen zu vermeiden. Negativkontrollen (s. unten) dienen der Objektivierung von Verunreinigungen im qPCR-Mix. Folgender qPCR-Mix wurde abhängig vom verwendeten Primer (herstellerabhängig) in einem separaten Mikroreaktionsgefäß vorgelegt.

**Tab. 3.5:** Biomers Reaktionsmix für die qPCR

Menge	Zusatz
10,0 $\mu\text{l}$	GoTaq <sup>®</sup> qPCR Master Mix 2x
0,5 $\mu\text{l}$	Primer s (1 $\mu\text{M}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	Primer as (1 $\mu\text{M}$ )
ad 18 $\mu\text{l}$	HPLC-Wasser

**Tab. 3.6:** Qiagen Reaktionsmix für die qPCR

Menge	Zusatz
10,0 $\mu\text{l}$	GoTaq <sup>®</sup> qPCR Master Mix 2x
1,5 $\mu\text{l}$	Qiagen QuantiTect <sup>®</sup> Primer Assay
ad 18 $\mu\text{l}$	HPLC-Wasser

18  $\mu\text{l}$  qPCR-Mix wurden anschließend in einem qPCR-Mikroreaktionsgefäß vorgelegt und 2  $\mu\text{l}$  cDNA Probe (1:10 verdünnt) hinzugefügt (bei der Negativkontrolle wurden stattdessen 2  $\mu\text{l}$  HPLC-Wasser hinzugefügt). Nach kurzem Anzentrifugieren wurde die Probe in der qPCR-Maschine einem primer-spezifischen (zyklischen) Temperaturverlauf ausgesetzt (s. Tab. 3.7). Um die Spezifität der Methode zu erhöhen (Unterscheidung zwischen zu untersuchenden und unspezifischen qPCR-Produkten), wurde hierbei eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die entstandene DNA durch kontinuierliche Temperaturerhöhung von 55 °C auf 95 °C aufgeschmolzen wurde. Bei einer für das untersuchte Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert dieses und die sich dabei ergebende Änderung der Fluoreszenz konnte zur Spezifitätsbestimmung verwendet werden.

**Tab. 3.7:** Bedingungen für die qPCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	5 sek	} 40
Annealing	primerspezifisch	15 sek	
Elongation	72 °C	5 sek	
Plate read			
Finale Elongation	72 °C	2 min	1
Plate read			
Schmelzkurve	55 – 95 °C	0,5 °C/6 sek	1

Für die Quantifizierung der exponentiellen Phase wurden die mit Hilfe der qPCRsoft 3.1 Software bestimmten Ct-Werte (englisch: threshold cycle) der einzelnen Proben verwendet. Diese beschreiben die jeweilige Zykluszahl, ab der das gemessene Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über das Hintergrundrauschen (definiert durch eine vorgegebene Grenze: Threshold) ansteigt. Zur Auswertung fand das Effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell, abgeleitet von der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, Anwendung (Pfaffl, 2001). Hierbei wird angenommen, dass die theoretisch optimale Effizienz (zyklenweise Verdopplung der Zielsequenz) praktisch nicht erreicht wird. Stattdessen wird das exponentielle Verhalten der ablaufenden Kettenreaktionen mit der Effizienz  $E$  beschrieben. Diese wurde für jedes untersuchte Gen aus einer Standardkurve bestimmt, die mit Hilfe unterschiedlicher Verdünnungsstufen (1:2, 1:10, 1:100, 1:1000) einer cDNA-Probe ermittelt wurde. Aus der logarithmischen Darstellung der Verdünnungsstufen gegenüber den zugehörigen Ct-Werten lässt sich gemäß

$$E = 10^{-\frac{1}{m}} - 1 \quad (2)$$

die Effizienz aus der Steigung  $m$  bestimmen.

Zur Bestimmung der relativen Genexpression einer Passage Px gegenüber Passage P1 werden neben den Ct-Werten für das untersuchte Gen (Zielgen) die Ct-Werte für ein weiteres Referenzgen zur Normierung benötigt. Hierfür bietet sich ein nicht reguliertes Haushaltsgen an (z.B. RPS27A: Ribosomal Protein S27a). Gemäß der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode wird zunächst die Differenz  $\Delta Ct$  der Ct-Werte der ersten Passage P1 und der zu untersuchenden Passage Px für das Ziel- und das Referenzgen gebildet:

$$\Delta Ct_{Zielgen} = Ct_{Zielgen,P1} - Ct_{Zielgen,Px} \quad (3)$$

$$\Delta Ct_{Referenzgen} = Ct_{Referenzgen,P1} - Ct_{Referenzgen,Px} \quad (4)$$

Alternativ können zur Bestimmung der relativen Genexpression einer Experimental- gegenüber einer Kontrollgruppe die entsprechenden Ct-Werte zu einem festen Zeitpunkt verwendet werden. In diesem Fall sind obige Ct-Werte aus Passage P1 durch Ct-Werte der Kontrollgruppe zu ersetzen, Ct-Werte aus Passage Px durch Ct-Werte der Experimentalgruppe. Die relative Genexpression des untersuchten Zielgens in Passage Px (bzw. der Experimentalgruppe in Relation zur Kontrollgruppe) ergibt sich anschließend mittels der zuvor bestimmten Effizienzen für das Ziel- und das Referenzgen gemäß:

$$Genexpression_{relativ} = \frac{E_{Zielgen}^{\Delta Ct_{Zielgen}}}{E_{Referenzgen}^{\Delta Ct_{Referenzgen}}} \quad (5)$$

Für jedes untersuchte Gen wurden drei unabhängige Testansätze verwendet und ausgewertet, um mögliche Fehlerquellen (z.B. Pipettierungsungenauigkeiten) zu minimieren.

### 3.2.6. Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung der zuvor spezifisch amplifizierte Nukleinsäuresequenzen erfolgt entsprechend ihrer Größe durch Elektrophorese in Agarosegelen. Hierbei ist die elektrophoretische Mobilität umgekehrt proportional zur molekularen Masse der Nukleinsäuren. Um ein 1,5% Gel herzustellen, wurden 1,5 g Agarose mit 100 ml TBE-Puffer (0,5 x) vermischt und in einer Mikrowelle erhitzt. Nach dem vollständigen Lösen der Agarose in der kochenden Flüssigkeit wurden 10  $\mu l$  GelRed hinzupipetiert. Dies diente der (im Vergleich zu Ethidiumbromid gefahrlosen) Anfärbung der PCR-Produkte durch Interkalierung in die doppelsträngige DNA. Das heiße Gemisch wurde dann in eine Elektrophoresekammer (mit eingestecktem Kamm zur Aussparung von Probenaschen) gefüllt. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und je 10  $\mu l$  einer PCR-Probe in eine Tasche pipetiert. Als Referenz wurde eine DNA-Leiter verwendet. Anschließend wurde eine Spannungsquelle angeschlossen und bei ca. 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Ein im PCR-Puffer enthaltener, sichtbarer Marker ermöglichte die Fortschrittsbeurteilung der Auftrennung (mitlaufende Banden: blau: 3-5 kb; gelb: <50 bp) und ermöglichte eine sinnvolle Terminierung. Die Visualisierung des Elektrophorese Ergebnisses erfolgte anschließend mittels Fluoreszenzsystem und der FusionCapt Advance SL2 Xpress Software.

### 3.2.7. Densitometrie

Die Quantifizierung der mittels semiquantitativer PCR gewonnener DNA-Produkte wurde mit der ImageJ 1.48v Software durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die Intensität von gelelektrophoretisch aufgetrennten Banden spezifischer Gene sowie eines geeigneten Haushaltsgens (z.B. EEF1A1: Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) in den verschiedenen Passagen digital bestimmt (densitometriert). Danach wurden die so ermittelten Intensitäten der spezifischen Gene in Relation zu der Intensität des Haushaltsgens in der entsprechenden Passage gesetzt (normiert). Die relative Expression wurde zuletzt als Verhältnis dieser normierten Expressionswerte in einer untersuchten Passage zu den Werten der zugehörigen Referenzpassage (P1) bestimmt (sog. Fold Change: relative Genexpressionsänderung).

## 3.3. Zytochemische Methoden

### 3.3.1. Ölrot O-Färbung

Die Ölrot O-Färbung diente der Anfärbung von Lipidtropfen bei adipogener Differenzierung. Nach Abschluss der Differenzierungsphase wurden die auf Mikrotiterplatten differenzierten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Danach wurde abgesaugt und bei offenem Deckel für weitere 10 Minuten luftgetrocknet. Die so behandelten Mikrotiterplatten wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und bei Bedarf aufgetaut. Zur Färbung wurden die Proben zunächst mit destilliertem Wasser gewaschen und danach für 5 Minuten 60% 2-Propanol aufgebracht. Darauf folgte eine 10 minütige Inkubation mit der Färbelösung (0,3% Gebrauchslösung: 24h vorher angesetzt und vor Gebrauch filtriert). Diese wurde danach erst mit 60% 2-Propanol und dann mit destilliertem Wasser gewegewaschen und das Ergebnis unter dem Mikroskop begutachtet. Zur Quantifizierung des Differenzierungsergebnisses wurden acht Fotos (20-fache Vergrößerung) von verschiedenen, zufällig eingestellten Bildausschnitten angefertigt. Diese wurden anschließend durch eine digitale Auswertung mittels AxioVision Rel. 4.8 Software analysiert und der prozentuale Flächenanteil gefärbter Areale in Bezug zur Gesamtfläche ermittelt.

### 3.3.2. Alizarin Rot S-Färbung

Die Alizarin Rot S-Färbung diente der Anfärbung von Kalziumhydrogenphosphat bei osteogener Differenzierung. Nach Abschluss der Differenzierungsphase wurden die auf Mikrotiterplatten differenzierten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit gekühltem Methanol fixiert. Danach wurde abgesaugt und bei offenem Deckel für weitere 10 Minuten luftgetrocknet. Die so behandelten Mikrotiterplatten wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und bei Bedarf aufgetaut. Zur Färbung wurde zunächst mit destilliertem Wasser gewaschen und danach 2 Minuten mit der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff wiederholt mit destilliertem Wasser gewegewaschen und das Deckglas luftgetrocknet. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch. Zur Quantifizierung des Differenzierungsergebnisses wurden acht Fotos (20-fache Vergrößerung) von verschiedenen, zufällig

eingestellten Bildausschnitten angefertigt. Diese wurden anschließend durch eine digitale Auswertung mittels AxioVision Rel. 4.8 Software analysiert und der prozentuale Flächenanteil gefärbter Areale in Bezug zur Gesamtfläche ermittelt.

### 3.4. Systematische Literaturrecherche

Die Suche nach Zeitschriftenartikeln wurde primär mit Hilfe der medizinischen Zeitschriftendatenbank PubMed durchgeführt. Hierbei wurde die klassische Freitext-Suche mit dem PubMed-spezifischen MeSH-Thesaurus kombiniert. Bei diesem handelt es sich um hierarchisch strukturierte Schlagwörter die für die genormte, inhaltliche Kennzeichnung der Zeitschriftenartikel verwendet wird. Die einzelnen Suchbegriffe (s. Tab. 3.8) wurden zeilenweise mit der boolschen Operation OR und die beiden Suchkategorien (Suchbegriffe 1 und Suchbegriffe 2) mit der boolschen Operation AND verknüpft. Außerdem wurde der Trunkierungsplatzhalter \* verwendet, um eventuellen Plural-Formen oder Wortvariationen einzuschließen.

**Tab. 3.8:** Liste der verwendeten Suchbegriffe sowie deren MeSH-Definition für die Literaturrecherche

Suchbegriffe 1	ggf. MeSH-Definition
abacterial loosening	
Arthroplasty, Replacement	Partial or total replacement of a joint. Year introduced: 1998
Arthroplasty, Replacement, Hip	Replacement of the hip joint. Year introduced: 1998
Arthroplasty, Replacement, Knee	Replacement of the knee joint. Year introduced: 1998
aseptic loosening	
joint replacement	
joint revision	
Prosthesis Failure	Malfunction of implantation shunts, valves, etc., and prosthesis loosening, migration, and breaking. Year introduced: 1991(1986)
prosthesis loosening	
reoperation	
replantation	
revision	
sterile loosening	

Suchbegriffe 2	ggf. MeSH-Definition
Mesenchymal Stem Cell Mesenchymal Stromal Cells	Bone-marrow-derived, non-hematopoietic cells that support hematopoietic stem cells. They have also been isolated from other organs and tissues such as umbilical cord blood, umbilical vein subendothelium, and Wharton Jelly. These cells are considered to be a source of multipotent stem cells because they include subpopulations of mesenchymal stem cells. Year introduced: 2012

Am 13.05.2015 lieferte folgende Suchanfrage 190 Einträge:

(abacterial loosening OR aseptic loosening OR Arthroplasty, Replacement OR Arthroplasty, Replacement, Hip OR Arthroplasty, Replacement, Knee OR joint replacement OR joint revision OR Prosthesis Failure OR prosthesis loosening OR reoperation OR replantation OR revision OR sterile loosening) AND (Mesenchymal Stem Cell OR Mesenchymal Stromal Cell OR Mesenchymal Stem Cell\* OR Mesenchymal Stromal Cell\*)

Am 28.05.2015 lieferte folgende Suchanfrage (nur Artikel der letzten 5 Jahre) 166 Einträge:

failure mechanism AND (hip or knee) AND arthroplasty

Folgende Suchanfrage im Katalog der Uni Würzburg lieferte am 30.06.2015 103 Treffer:

Freie Suche = Mesenchymal Stem Cell OR Freie Suche = Mesenchymal Stem Cell\* OR Freie Suche = Mesenchymal Stromal Cell OR Freie Suche = Mesenchymal Stromal Cell\*

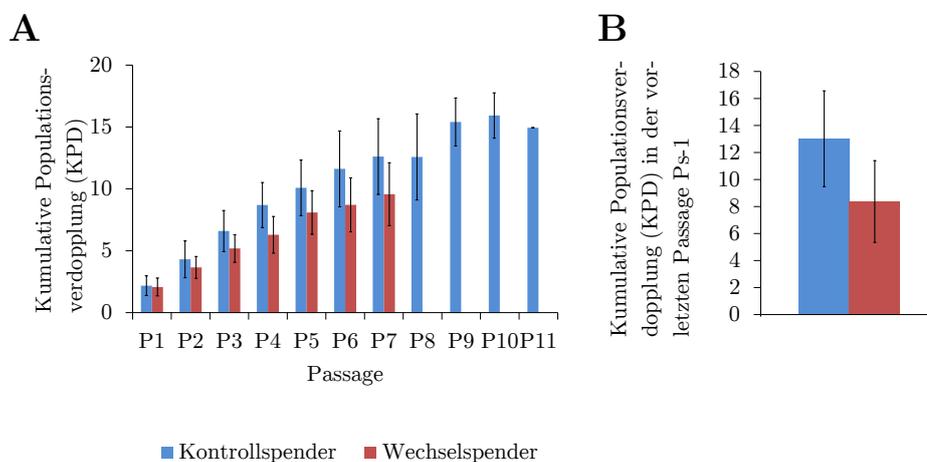
### 3.5. Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung oder als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der student's t-Test bzw. in Anlehnung an (Pfaffl et al., 2002) die REST 2009 V2.0.13 Software verwendet (Angabe in Abbildungen des Ergebnisteiles).

## 4. Ergebnisse

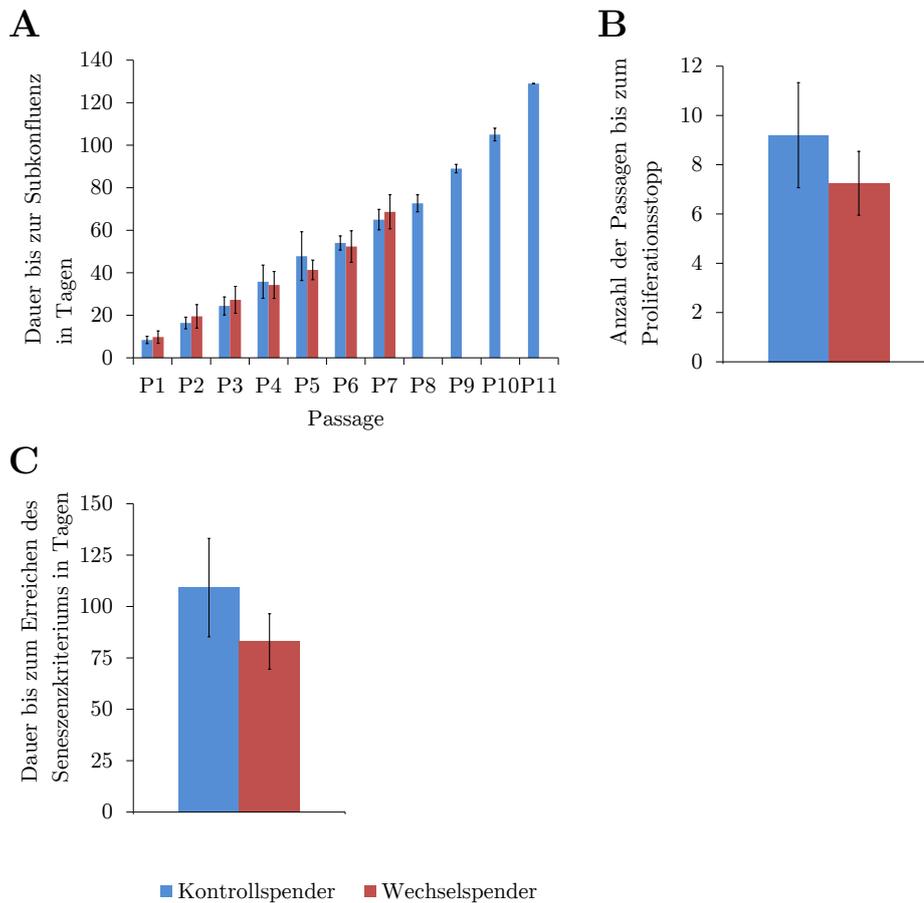
### 4.1. Vergleich des Wachstumsverhaltens im Verlauf der *in vitro* Kultivierung

Um die Proliferationskapazität der hMSC der beiden Gruppen (Kontroll- und Wechselspender) zu vergleichen, wurde das Wachstumsverhalten der einzelnen Zellpopulationen während der Langzeitkultur ausgewertet. Anhand des Verlaufes der Kumulativen Populationsverdopplung (KPD) (s. 3.1.3) lässt sich erkennen, dass die Kontrollspender-hMSC in jeder betrachteten Passage eine höhere KPD als die Wechselspender-hMSC erreichten (s. Abb. 4.1 A). Außerdem war die mittlere KPD in der vorletzten Passage Ps-1 (in der letzten Passage Ps wurde kulturtechnisch bedingt keine KPD ermittelt) der Kontrollspender-Gruppe höher als die der Wechselspender-Gruppe (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung:  $13,02 \pm 3,55$  vs.  $8,37 \pm 3,03$ ; student's t-Test lieferte keine signifikanten Gruppenunterschiede, s. Abb. 4.1 B).



**Abb. 4.1: Verlauf der kumulativen Populationsverdopplung (KPD) von Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu Wechselspender-hMSC während der *in vitro* Kultivierung.** **A** Kumulative Populationsverdopplung im Verlauf der *in vitro* Kultivierung. Diese wurden anhand der bei jeder Subkultivierung ermittelten Zellzahlen ab Passage P1 bis zur vorletzten Passage Ps-1 bestimmt. **B** Mittlere Kumulative Populationsverdopplung in der vorletzten Passage Ps-1. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Statistische Auswertung mit student's t-Test. P1 bis P4: n Kontrollspender = 5; n Wechselspender = 4; P5: n Kontrollspender = 5; n Wechselspender = 3; P6 und P7: n Kontrollspender = 4; n Wechselspender = 3; P8: n Kontrollspender = 3; P9 und P10: n Kontrollspender = 2; P11: n Kontrollspender = 1.

Die Dauer bis zum Erreichen einer bestimmten Passage variierten, sodass in Passage P1 bis P3 und P7 die Kontrollspender-hMSC und in Passage P4 bis P6 die Wechselspender-hMSC schneller die Subkonfluenz erreichten (s. Abb. 4.2 A). Weiterhin zeigte sich, dass die Kontrollspender-hMSC im Durchschnitt eine höhere Passage und eine längere Dauer in Kultur bis zum Eintritt des Proliferationsstopps erreichten (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung:  $9,20 \pm 2,14$  Passagen nach  $109 \pm 24$  Tagen vs.  $7,25 \pm 1,30$  Passagen nach  $83 \pm 13$  Tagen; student's t-Test lieferte keine signifikanten Gruppenunterschiede, s. Abb. 4.2 B und C).



**Abb. 4.2: Das Wachstumsverhalten von Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu Wechselspender-hMSC im Verlauf der in vitro Kultivierung.** **A** Dauer (in Tagen) bis zum Erreichen der Subkonfluenz im Verlauf der in vitro Kultivierung. **B** Mittlere Anzahl der Passagen bis zum Eintritt des Proliferationsstopps. **C** Mittlere Dauer (in Tagen) bis zum Erreichen der Seneszenz. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Statistische Auswertung mit student's t-Test. P1 bis P4: n Kontrollspender = 5; n Wechselspender = 4; P5: n Kontrollspender = 5; n Wechselspender = 3; P6 und P7: n Kontrollspender = 4; n Wechselspender = 3; P8: n Kontrollspender = 3; P9 und P10: n Kontrollspender = 2; P11: n Kontrollspender = 1.

## 4.2. Vergleich des Seneszenzverhaltens im Verlauf der in vitro Kultivierung

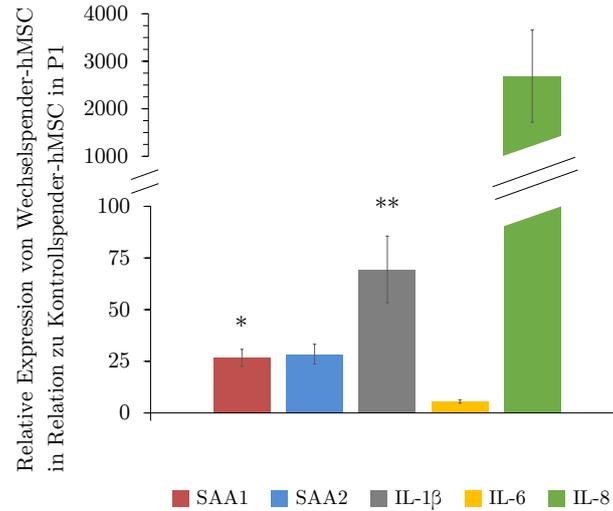
Zur Beurteilung des Seneszenzverhaltens der hMSC der beiden Gruppen wurde die Expression Seneszenz-assoziierte Marker (SAA1: Serum Amyloid A 1, SAA2: Serum Amyloid A 2, IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ , IL-6: Interleukin-6, IL-8: Interleukin-8) im Verlauf der in vitro Alterung auf mRNA-Ebene untersucht (s. 3.2.5).

### 4.2.1. Analyse des Expressionsmusters ausgewählter Seneszenz-assoziiierter Marker im Verlauf der in vitro Alterung

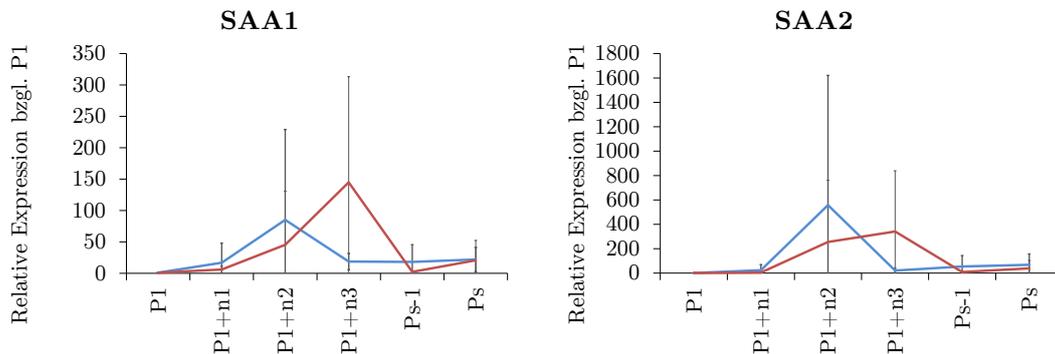
Da die verschiedenen Zellpopulationen einen individuellen Alterungsprozess und daraus resultierend eine unterschiedliche Kulturdauer (Anzahl an Passagen) bis zum Erreichen des Proliferationsstopps aufwiesen, wurde die individuelle Kultivierungsdauer zwischen der ersten (P1) und der vorletzten Passage (Ps-1) in Anlehnung an (Ebert et al., 2015) in vier Quartale eingeteilt, um die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Populationen zu gewährleisten. Untersucht wurden dabei die Passage P1 (als Referenz für die Genexpression), Passage P1+n1, P1+n2 und P1+n3 jeweils am Ende des ersten, zweiten und dritten Quartals, Passage Ps-1 als vorletzte Passage und Passage Ps, in der der Proliferationsstopp beobachtet wurde.

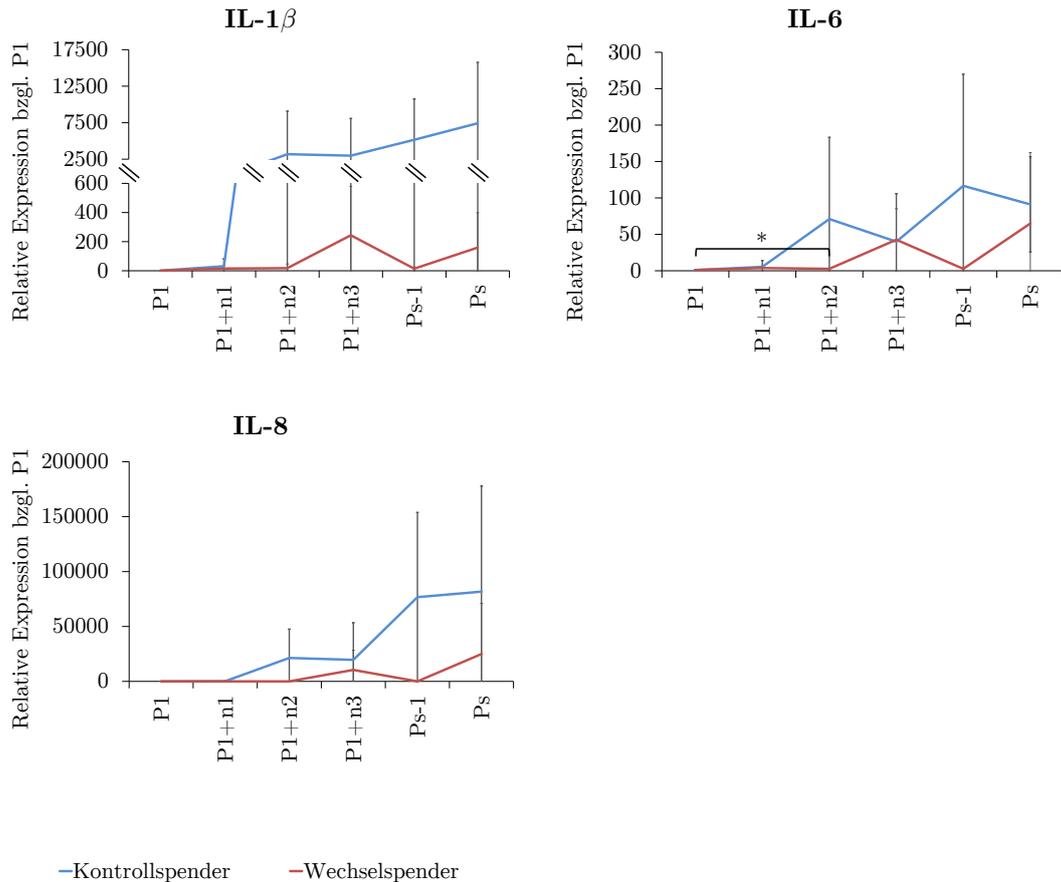
Nach Auswertung der qPCR Ergebnisse der verschiedenen Seneszenz-assoziierten Marker (SAA1, SAA2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) sowie der Haushaltsgene COX4I1 (Cytochrom c oxidase subunit 4 isoform 1) und RPS27A (Ribosomal Protein S27a) wurde die relative Expression mit Hilfe des Effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodells bestimmt (s. 3.2.5). Zur Einordnung der im Verlauf der Kultivierung bestimmten relativen Expressionswerte wurde zunächst das relative Gen-Expressionsniveau der Wechselspender in Relation zu den Kontrollspendern in Passage P1 ermittelt. Hierbei zeigte sich für alle untersuchten Marker eine erhöhte mittlere relative Expression (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler: SAA1:  $26,68 \pm 4,10$  \*:  $p < 0,05$ ; SAA2:  $28,48 \pm 4,77$ ; IL-1 $\beta$ :  $69,47 \pm 16,15$  \*\*:  $p < 0,01$ ; IL-6:  $5,52 \pm 0,82$ ; IL-8:  $2687,07 \pm 970,76$ ; die angegebenen Signifikanzen wurden in Anlehnung an (Pfaffl et al., 2002) mit der REST 2009 V2.0.13 Software ermittelt; s. Abb. 4.3).

Im Verlauf der Kultivierung zeigten die relativen Expressionswerte der beiden Gruppen bezüglich Passage P1 genabhängig unterschiedliche Verlaufsformen (s. Abb. 4.4). SAA1 und SAA2 zeigten einen phasenhaften Verlauf mit niedrigen relativen Expressionswerten zu Beginn und am Ende der Kultivierung und einer maximalen relativen Genexpression zwischen Passage P1+n1 und P1+n3. Hierbei erreichten die Wechselspender ihr Expressions-Maximum stets eine Passage später als die Kontrollspender. Die anderen untersuchten Marker (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) zeigten einen diskontinuierlichen Anstieg der relativen Expression, wobei die Kontrollspender stets höhere Werte als die Wechselspender erreichten (Ausnahme: IL-6 zum Zeitpunkt P1+n3). Aufgrund der großen Variabilität der einzelnen Spenderwerte ergab sich nur für IL-6 zum Zeitpunkt P1+n2 der Wechselspender eine signifikant erhöhte relative Expression bezüglich Passage P1 (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung: Passage P1 vs. Passage P1+n2:  $1,00 \pm 0,00$  vs.  $2,67 \pm 0,95$  \*:  $p < 0,05$ ; student's t-test).



**Abb. 4.3:** Die relative Expression Seneszenz-assoziiierter Marker (SAA1: Serum Amyloid A 1, SAA2: Serum Amyloid A 2, IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ , IL-6: Interleukin-6, IL-8: Interleukin-8) von Wechselspender-hMSC in Relation zu Kontrollspender-hMSC in Passage P1. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der relativen Expression Seneszenz-assoziiierter Marker (SAA1, SAA2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), die mittels qPCR in Passage P1 ermittelt wurden. Die relative Expression wurde unter Verwendung der Haushaltsgens COX411 (Cytochrom c oxidase subunit 4 isoform 1) mit Hilfe des Effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodells bestimmt. Die Intensitätsbestimmung wurde mit Hilfe der qPCRsoft 3.1 Software durchgeführt. Die angegebenen Signifikanzen wurden in Anlehnung an (Pfaffl et al., 2002) mit der REST 2009 V2.0.13 Software ermittelt (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ). SAA1, SAA2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8: n Kontrollspender: 5; n Wechselspender: 5





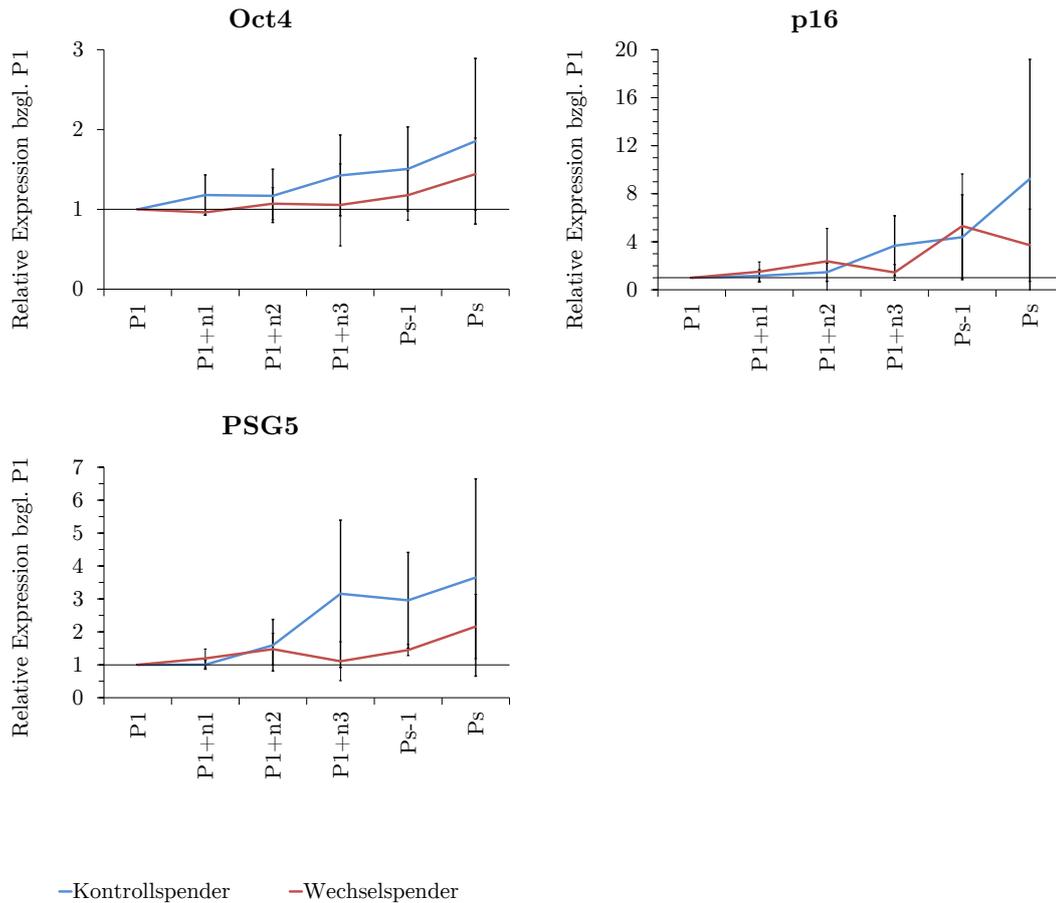
**Abb. 4.4:** Die relative Expression Seneszenz-assoziiierter Marker (SAA1: Serum Amyloid A 1, SAA2: Serum Amyloid A 2, IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ , IL-6: Interleukin-6, IL-8: Interleukin-8) von Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu Wechselspender-hMSC bezüglich Passage P1 im Verlauf der *in vitro* Kultivierung. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Expression Seneszenz-assoziiierter Marker (SAA1, SAA2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), die mittels qPCR in den unterschiedlichen Abschnitten der Kultivierung bestimmt wurden. Da die verschiedenen Zellpopulationen eine unterschiedliche Anzahl von Passagen bis zum Eintritt des Proliferationsstopps aufwiesen, wurde die Kultivierungsdauer für die vergleichende Expressionsanalyse in Anlehnung an (Ebert et al., 2015) in vier Quartale eingeteilt: P1: erste Passage der *in vitro* Kultivierung; P1+n1, P1+n2 und P1+n3: Passage am Ende des ersten, zweiten und dritten Quartals; Ps-1: vorletzte Passage; Ps: seneszente Passage (Proliferationsstopp). Die relative Expression wurde unter Verwendung der Haushaltsgens RPS27A (Ribosomal Protein S27a) mit Hilfe des Effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodells bestimmt. Die Intensitätsbestimmung wurde mit Hilfe der qPCRsoft 3.1 Software durchgeführt (\*:  $p < 0,05$ ; student's t-test). SAA1, SAA2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8: n Kontrollspender: P1, P1+n1, P1+n2: 5; P1+n3, Ps-1: 4; Ps: 3; n Wechselspender: P1, P1+n2, Ps: 5; P1+n1, P1+n3: 4; Ps-1: 2.

### 4.3. Vergleich der Stammzeleigenschaften im Verlauf der *in vitro* Kultivierung

Um die Stammzell- und Seneszenzeigenschaften der hMSC der beiden Gruppen zu vergleichen, wurde die Expression eines klassischen Stammzell-assoziierten Markers (Oct4: Octamer binding transcription factor 4) sowie klassischer Seneszenz-assoziiierter Marker (p16: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, PSG5: Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5) im Verlauf der *in vitro* Kultivierung auf mRNA-Ebene untersucht (s. 3.2.4).

#### 4.3.1. Analyse des Expressionsmusters ausgewählter Stammzell- und Seneszenz-assoziiierter Marker im Verlauf der *in vitro* Kultivierung

Aufgrund des individuellen Alterungsprozesses der verschiedenen Zellpopulationen wurde zum Zwecke der Vergleichbarkeit eine Einteilung der Kultivierungsdauer in Quartale vorgenommen (s. 4.2.1). Nach densitometrischer Auswertung der semiquantitativen PCR Produkte der verschiedenen untersuchten Marker (Oct4, p16 und PSG5) sowie des zugehörigen Haushaltsgens *EEF1A1* (Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) wurde die relative Expression (Fold Change, s. 3.2.7) bestimmt. Es zeigte sich eine Zunahmetendenz der relativen Expression für alle drei untersuchten Gene im Verlauf der Kultivierung (s. Abb. 4.5). Auffällig war weiterhin, dass mit Ausnahme der untersuchten Zeitpunkte P1+n2 und Ps-1 für p16 und Zeitpunkt P1+n1 für PSG5 die relative Genexpression der Kontrollspender stets stärker ausgeprägt war als die der Wechselspender. In der seneszenten Passage Ps zeigten sich nicht signifikante Mittelwertsunterschiede (statistische Auswertung mit student's t-Test) der relativen Genexpression zwischen den beiden Gruppen: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung: Kontrollspender vs. Wechselspender: Oct4:  $1,85 \pm 1,04$  vs.  $1,44 \pm 0,45$ ; p16:  $9,25 \pm 9,94$  vs.  $3,71 \pm 3,02$ ; PSG5:  $3,65 \pm 3,00$  vs.  $2,16 \pm 0,98$ .



**Abb. 4.5: Die relative Expression Stammzell- und Seneszenz-assoziiierter Marker (Oct4: Octamer binding transcription factor 4, p16: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A und PSG5: Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5) von Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu Wechselspender-hMSC im Verlauf der in vitro Kultivierung.** Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Expression Stammzell- und Seneszenz-assoziiierter Marker (Oct4, p16 und PSG5), die mittels Densitometrie der semiquantitativen PCR Produkte in den unterschiedlichen Abschnitten der Kultivierung quantifiziert wurden. Da die verschiedenen Zellpopulationen eine unterschiedliche Anzahl von Passagen bis zum Eintritt des Proliferationsstopps aufwiesen, wurde die Kultivierungsdauer für die vergleichende Expressionsanalyse in Anlehnung an (Ebert et al., 2015) in vier Quartale eingeteilt: P1: erste Passage der in vitro Kultivierung; P1+n1, P1+n2 und P1+n3: Passage am Ende des ersten, zweiten und dritten Quartals; Ps-1: vorletzte Passage; Ps: seneszente Passage (Proliferationsstopp). Die densitometrisch ermittelte Intensität der Genexpression wurde zunächst mit Hilfe der Intensität des zugehörigen Haushaltsgens EEF1A1 (Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) normiert und anschließend in Bezug zu der relativen Expression in Passage P1 gesetzt. Die Intensitätsbestimmung wurde mit Hilfe der ImageJ 1.48v Software durchgeführt. Statistische Auswertung mit student's t-Test. Oct4, p16, PSG5: n Kontrollspender: P1, P1+n1, P1+n2: 5; P1+n3, Ps-1: 4; Ps: 3; n Wechselspender: P1, P1+n2, Ps: 5; P1+n1, P1+n3: 4; Ps-1: 2.

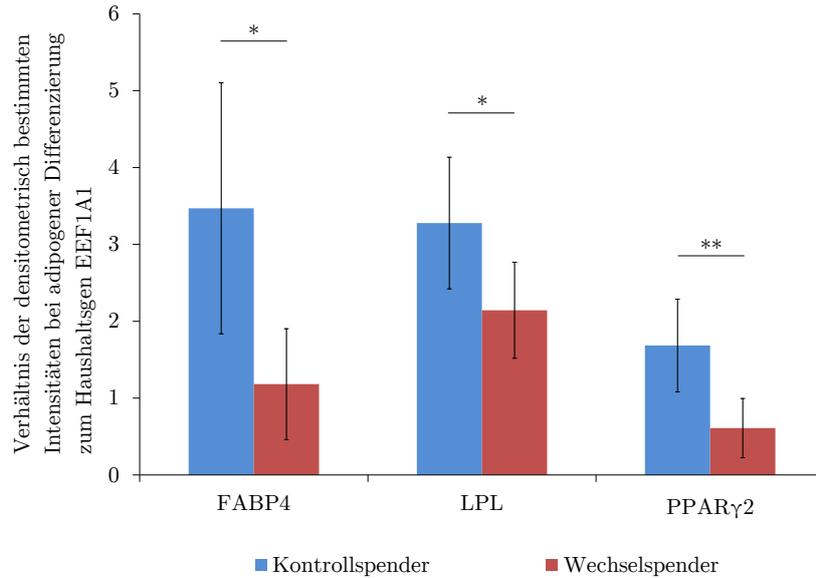
## 4.4. Vergleich der in vitro Differenzierungskapazität

Um die Differenzierungskapazität der hMSC der beiden Gruppen zu vergleichen, wurden die Zellen zwei Wochen adipogen bzw. osteogen differenziert und anschließend die Expression klassischer Marker für die adipogene Differenzierung (FABP4: Fatty acid binding protein 4, LPL: Lipoproteinlipase und PPAR $\gamma$ 2: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2) und die osteogene Differenzierung (ALP: Alkalische Phosphatase, OC: Osteocalcin und OP: Osteopontin) auf mRNA-Ebene ausgewertet (s. 3.2.7). Außerdem dienten spezifische Färbungen (adipogen: Ölrot O-Färbung nach dreiwöchiger Differenzierung, osteogen: Alizarin Rot S-Färbung nach vierwöchiger Differenzierung) zur weiteren Beurteilung der Differenzierungsfähigkeit (s. 3.3.1 und 3.3.2).

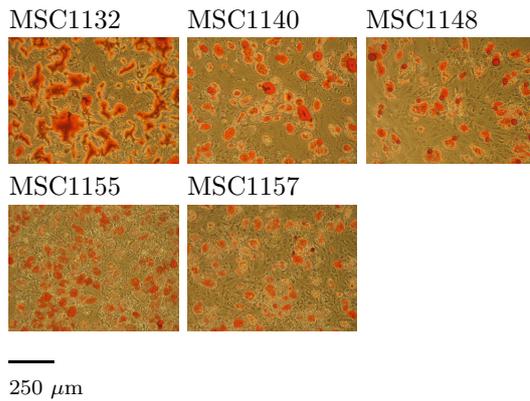
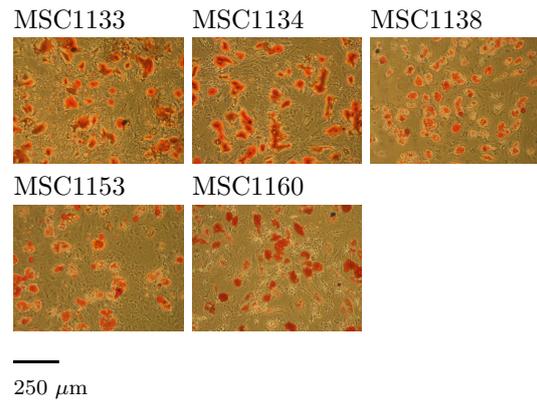
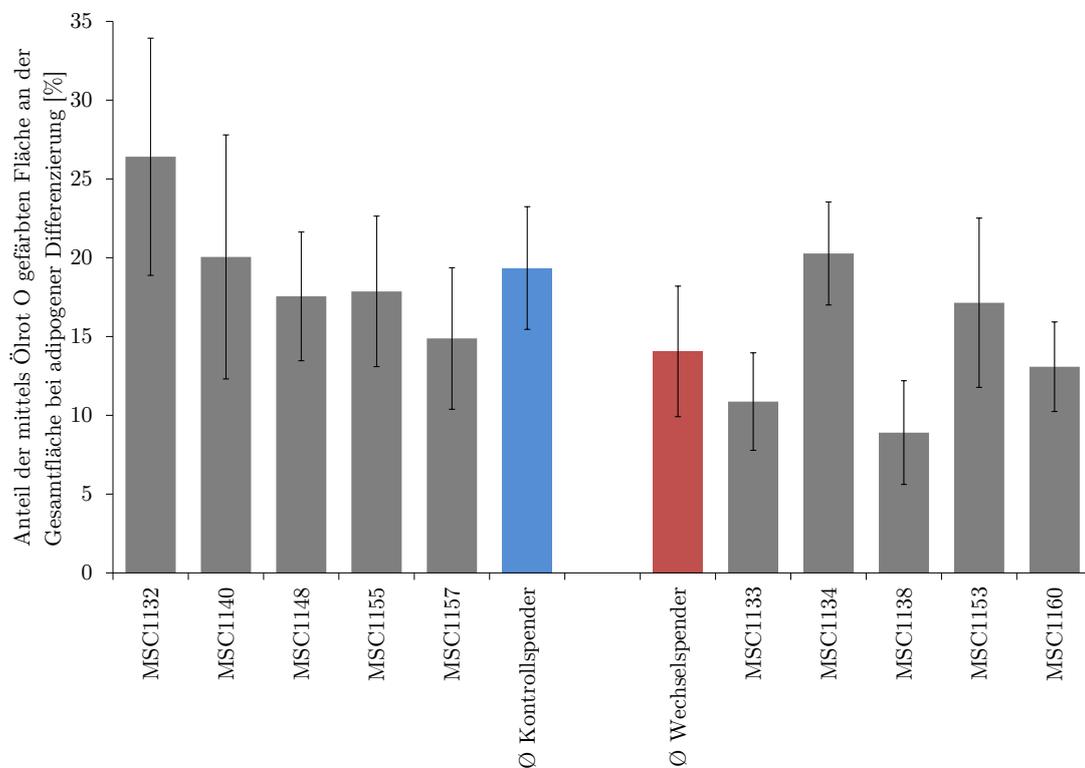
### 4.4.1. Adipogene Differenzierung

Die während der zweiwöchigen Differenzierungsphase mit konventionellem MSC-Kulturmedium versorgten Zellkulturen der einzelnen Spender (undifferenzierte Kontrollen) exprimierten allesamt keinen der untersuchten adipogenen Marker (FABP4, LPL, PPAR $\gamma$ 2). Daher konnte die densitometrisch ermittelte Intensität der Genexpression der differenzierten Probe nicht in das Verhältnis zur zugehörigen undifferenzierten Probe (sog. Fold Change als relative Maßzahl für die Vervielfältigung der Genexpression) gesetzt werden (s. 3.2.7). Alternativ wurde die ermittelte Intensität der differenzierten Probe auf die zugehörige Intensität des Haushaltsgens *EEF1A1* bezogen. Auffällig hierbei war, dass bezüglich aller untersuchten adipogenen Marker die so ermittelte Maßzahl der Kontrollspender signifikant höher war als die der Wechselspender (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung: Kontrollspender vs. Wechselspender: FABP4:  $3,47 \pm 1,63$  vs.  $1,18 \pm 0,72$  \*:  $p < 0,05$ ; LPL:  $3,28 \pm 0,86$  vs.  $2,14 \pm 0,62$  \*:  $p < 0,05$ ; PPAR $\gamma$ 2:  $1,68 \pm 0,60$  vs.  $0,61 \pm 0,39$  \*\*:  $p < 0,01$ ; student's t-test; s. Abb. 4.6).

Nach dreiwöchiger adipogener Differenzierung, anschließender Färbung und digitaler Auswertung zeigte sich ein nicht signifikanter Mittelwertsunterschied (statistische Auswertung mit student's t-Test) des mittels Ölrot O gefärbten Flächenanteils zwischen den beiden Gruppen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung: Kontrollspender vs. Wechselspender:  $19,35 \pm 3,89\%$  vs.  $14,05 \pm 4,14\%$ ). Auffällig hierbei war eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Spendern (s. Abb. 4.7).



**Abb. 4.6:** Die Expressionsstärke klassischer adipogener Marker (FABP4: Fatty acid binding protein 4, LPL: Lipoproteinlipase und PPAR $\gamma$ 2: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2) von Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu Wechselspender-hMSC bei adipogener Differenzierung. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Expressionsstärke adipogener Marker (FABP4, LPL, PPAR $\gamma$ 2), die mittels Densitometrie der semiquantitativen PCR Produkte von differenzierten Proben quantifiziert wurden. Da sämtliche undifferenzierten Kontrollen die untersuchten adipogenen Marker nicht exprimierten, wurde zur Beurteilung der Expressionsstärke die densitometrisch ermittelte Intensität eines adipogenen Markers der differenzierten Probe auf die Intensität des zugehörigen Haushaltgens EEF1A1 (Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) bezogen. Die Intensitätsbestimmung wurde mit Hilfe der ImageJ 1.48v Software durchgeführt (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; student's t-test). FABP4, LPL, PPAR $\gamma$ 2: n Kontrollspender = 7; n Wechselspender = 7.

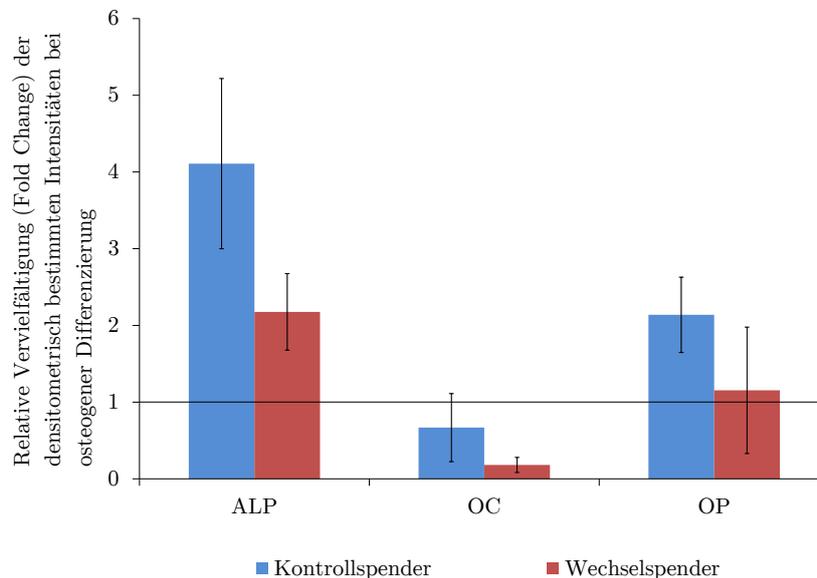
**A Kontrollspender****Wechselspender****B**

**Abb. 4.7: Die adipogene Differenzierungsfähigkeit von Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu Wechselspender-hMSC.** **A** Abgebildet sind die mit Hilfe von Ölrot O gefärbten intrazellulären Lipidvesikel der Mesenchymalen Stammzellen, die drei Wochen durch Zugabe eines entsprechenden Differenzierungsmediums kultiviert wurden (je ein exemplarischer Ausschnitt, 10 fache Vergrößerung). **B** Softwaregestützte Quantifizierung der mit Hilfe des Farbstoffes angefärbten Lipidvesikel. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Es wurden jeweils 8 Bilder mit Hilfe des automatischen Messprogrammes der AxioVision Rel. 4.8 Software analysiert. Statistische Auswertung mit student's t-Test. N Kontrollspender = 5; n Wechselspender = 5.

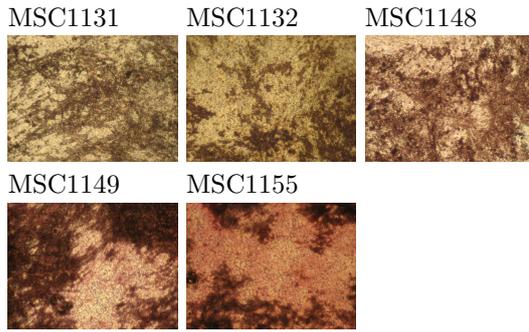
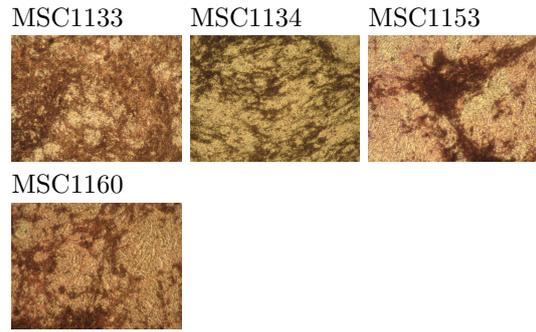
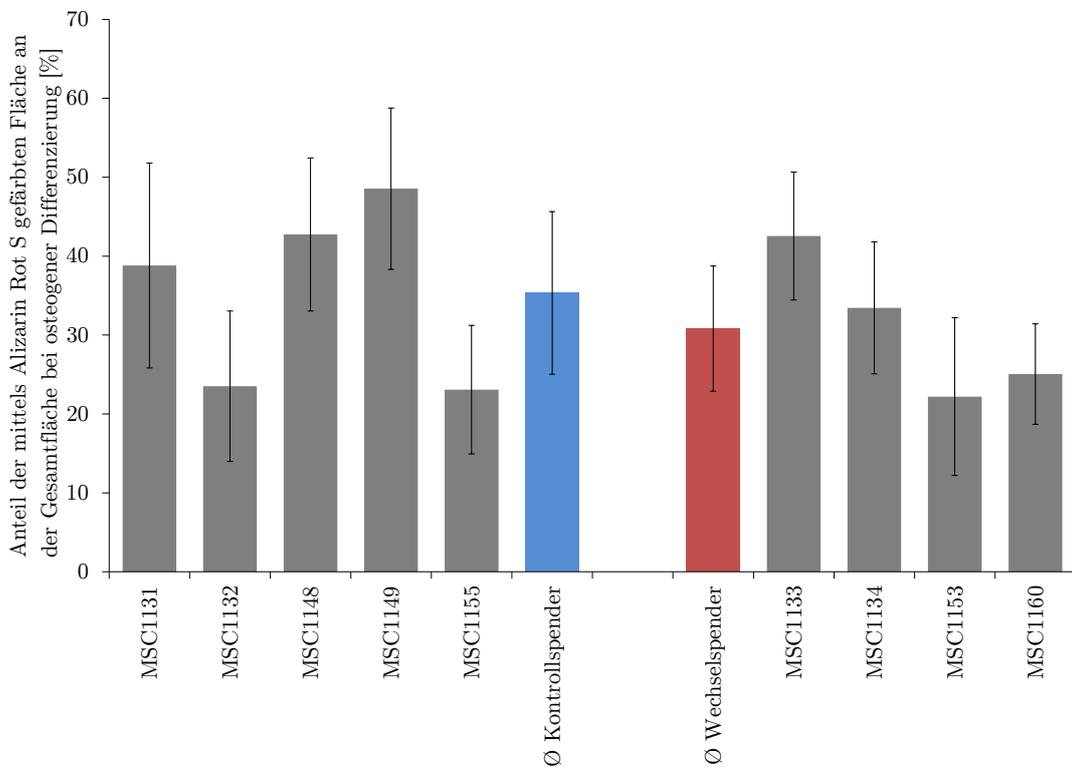
#### 4.4.2. Osteogene Differenzierung

Nach densitometrischer Auswertung der semiquantitativen PCR Produkte der verschiedenen untersuchten osteogenen Marker (ALP, OC und OP) sowie des zugehörigen Haushaltsgens *EEF1A1* in den undifferenzierten und differenzierten Proben wurde die relative Expression (Fold Change, s. 3.2.7) bestimmt. Auffällig hierbei war, dass bezüglich aller untersuchten osteogenen Marker die so bestimmte relative Vervielfältigung der Kontrollspender höher war als die der Wechselspender (nicht signifikant, statistische Auswertung mit student's t-Test). (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung: Kontrollspender vs. Wechselspender: ALP:  $4,11 \pm 1,11$  vs.  $2,18 \pm 0,50$ ; OC:  $0,67 \pm 0,44$  vs.  $0,18 \pm 0,10$ ; OP:  $2,14 \pm 0,49$  vs.  $1,15 \pm 0,82$ ; s. Abb. 4.8).

Nach vierwöchiger osteogener Differenzierung, anschließender Färbung und digitaler Auswertung zeigte sich ein nicht signifikanter Mittelwertsunterschied (statistische Auswertung mit student's t-Test) des mittels Alizarin Rot S gefärbten Flächenanteils zwischen den beiden Gruppen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung: Kontrollspender vs. Wechselspender:  $35,34 \pm 10,31\%$  vs.  $30,81 \pm 7,94\%$ ). Auffällig war eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Spendern (s. Abb. 4.9).



**Abb. 4.8: Die Expressionstärke klassischer osteogener Marker (ALP: Alkalische Phosphatase, OC: Osteocalcin und OP: Osteopontin) von Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu Wechselspender-hMSC bei osteogener Differenzierung.** Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der relativen Vervielfältigung (Fold Change) osteogener Marker (ALP, OC, OP), die mittels Densitometrie der semiquantitativen PCR Produkte von differenzierten und undifferenzierten Proben quantifiziert wurden. Nach Normierung der densitometrisch ermittelten Intensität eines osteogenen Markers auf die Intensität des zugehörigen Haushaltsgens *EEF1A1* (Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1) wurde der sog. Fold Change (relative Vervielfältigung) als Verhältnis der differenzierten zu der undifferenzierten Probe ermittelt. Die Intensitätsbestimmung wurde mit Hilfe der ImageJ 1.48v Software durchgeführt. Statistische Auswertung mit student's t-Test. ALP: n Kontrollspender: 2; n Wechselspender: 3; OC und OP: n Kontrollspender: 4; n Wechselspender: 3.

**A Kontrollspender**250  $\mu\text{m}$ **Wechselspender**250  $\mu\text{m}$ **B**

**Abb. 4.9: Die osteogene Differenzierungsfähigkeit von Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu Wechselspender-hMSC.** **A** Abgebildet ist die mit Hilfe von Alizarin Rot S gefärbte mineralisierte extrazelluläre Matrix der Mesenchymalen Stammzellen, die vier Wochen durch Zugabe eines entsprechenden Differenzierungsmediums kultiviert wurden (je ein exemplarischer Ausschnitt, 10 fache Vergrößerung). **B** Softwaregestützte Quantifizierung der mit Hilfe des Farbstoffs angefärbten mineralisierten Extrazellulärmatrix. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Es wurden jeweils 8 Bilder mit Hilfe des automatischen Messprogrammes der AxioVision Rel. 4.8 Software analysiert. Statistische Auswertung mit student's t-Test. N Kontrollspender = 5; n Wechselspender = 4.

## 5. Diskussion

### 5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchung des *in vitro* Wachstumsverhaltens zeigte für die Wechselspender-hMSC einen Trend zu eingeschränkter Proliferationskapazität. Sie erreichten zum einen eine geringere Gesamtkumulative-Populationsverdopplung (KPD) und zum anderen war ihre Kulturdauer/Anzahl der Passagen bis zum Proliferationsstopp reduziert (nicht signifikante Unterschiede). Außerdem konnte mit Hilfe von Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene das Vorhandensein einer proinflammatorischen Prägung zu Beginn der Kultivierung (Passage P1) nachgewiesen werden. Hierbei zeigten Seneszenz- und Inflammations-assoziierte Gene (SAA1: Serum Amyloid A 1, SAA2: Serum Amyloid A 2, IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ , IL-6: Interleukin-6, IL-8: Interleukin-8) eine im Vergleich zu Kontrollspender-hMSC verstärkte Expression. Im Rahmen der Zellalterung konnte anhand des Verlaufs dieser Marker die Ausbildung eines Seneszenz-assoziierten proinflammatorischen Phänotyps (SASP) in beiden Gruppen beobachtet werden. Weitere Seneszenzmarker (p16: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, PSG5: Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5) bestätigten durch Expressionszunahme während des Kultivierungsprozesses die gruppengleiche Seneszenzentwicklung. Auch die Untersuchung eines klassischen Stammzellmarkers (Oct4: Octamer binding transcription factor 4) zeigte das dauerhafte (gruppengleiche) Vorhandensein dieser Eigenschaft über die gesamte Lebensspanne der hMSC. Im Rahmen von Differenzierungsversuchen konnte weder ein adipogenes noch ein osteogenes Differenzierungsdefizit nachgewiesen werden. Zwar zeigten die Wechselspender-hMSC eine signifikant niedrigere Expression adipogener Marker (FABP4: Fatty acid binding protein 4, LPL: Lipoproteinlipase und PPAR $\gamma$ 2: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2); in der zusätzlich durchgeführten spezifischen Ölrot O-Färbung konnte jedoch lediglich eine tendenziell geringere adipogene Differenzierungsfähigkeit beobachtet werden. Bezüglich der osteogenen Differenzierung konnte weder auf mRNA-Ebene (osteogene Marker: ALP: Alkalische Phosphatase, OC: Osteocalcin und OP: Osteopontin) noch mit Hilfe der spezifischen Alizarin Rot S-Färbung ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich auch hier ein Trend zu einer weniger stark ausgeprägten osteogenen Differenzierung der Wechselspender-hMSC.

### 5.2. Diskussion der Methoden

#### 5.2.1. Definition des Patientenkollektivs

Um geeignetes Spendermaterial für die experimentellen Untersuchungen gewinnen zu können, wurden zunächst Kriterien für den Einschluss von Patienten in die beiden Gruppen definiert. Da die Implantation von Hüft- und Kniegelenksendoprothesen zahlenmäßig mit Abstand am häufigsten durchgeführt wird, wurden Operationen an diesen beiden Gelenken als besonders relevant im Sinne der Patienten eingestuft. Patienten, die sich einer Revisionsoperation an einem dieser beiden Gelenke aufgrund einer aseptischen Prothesenlockerung unterziehen mussten, wurden als Wechselspender definiert. Die Beurteilung, ob es sich bei der vorliegenden Lockerung tatsächlich um ein aseptisches Geschehen handelte, wurde auf der einen Seite durch objektive Parameter (z.B. Bildgebung,

Laborwerte), auf der anderen Seite durch die (intraoperative) Einschätzung sehr erfahrener Operateure durchgeführt. Wurde hierbei der Verdacht eines septischen Geschehens geäußert, war dies ein Ausschlussgrund. Als Kontrollspender dienten nur Patienten, denen primär eine Hüftendoprothese implantiert wurde. Diese artifizielle Definition einer Kontrollgruppe wurde u.a. aufgrund der Verfügbarkeit von menschlichen Gewebeproben durchgeführt. Die Vergleichbarkeit von hMSC aus diesen unterschiedlichen Lokalisationen (Hüfte und Knie) wurde im Rahmen dieser Arbeit angenommen und stellt eine mögliche Limitation dar. Ein Patientenkollektiv, welches Patienten mit einer nicht-gelockerten Prothese beinhaltet, die gemäß des Alters und der Prothesenstandzeit mit den Wechselspendern korreliert sind, wäre als alternative Kontrollgruppe überzeugender. Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit (eine extra durchzuführende invasive Probenentnahme bei gesunden Patienten wäre hierfür notwendig) wurde dieses Vorgehen jedoch ausgeschlossen. Aus der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Patientenproben ergab sich eine weitere Limitation der Studie. Dennoch konnten anhand der durchgeführten Experimente Tendenzen in der Ausprägung der unterschiedlichen regenerativen Eigenschaften abgeleitet werden, die als Grundlage für das Verständnis eines solchen Lockerungsprozesses dienen können. Aufgrund des Studiendesigns ist eine Kausalitätsbetrachtung mit den erhobenen Daten nicht möglich. Ob mögliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen Ursache oder Folge einer aseptischen Prothesenlockerung sind, ist somit mit Hilfe der durchgeführten *in vitro* Versuche nicht beantwortbar. Eine hierfür notwendige longitudinale Betrachtung/Untersuchung von Patienten vom Zeitpunkt einer primären Prothesenimplantation bis zum möglichen Auftreten einer aseptischen Prothesenlockerung war im Rahmen dieser (zeitlich begrenzten) Arbeit nicht umsetzbar.

### **5.2.2. Isolierung und *in vitro* Kultivierung/Differenzierung von hMSC**

Die Isolation der hMSC fand aus intraoperativ gewonnenem Material statt, das im Rahmen der Vorbereitung auf die Prothesenimplantation anfiel (s. 3.1.1). Hierbei handelte es sich um Spongiosa, die z.B. aus der Hüftpfanne oder der Femurmetaphyse stammte. Eine enger definierte Vorgabe des Entnahmeortes war nicht möglich, da im Sinne des Patienten keine zusätzliche Probenentnahme durchgeführt wurde. Dementsprechend wurden die so gewonnenen Zellen als Repräsentanten der lokalen und für die Fixierung der Prothese relevanten hMSC-Nische angesehen. Das steril verpackte Material wurde unter Laborbedingungen keimfrei weiterverarbeitet und die daraus extrahierten Zellen in definierten Zellzahlen in Zellkulturflaschen ausgesät. Die weitere Kultivierung fand unter standardisierten Bedingungen statt (u.a. konstante Inkubationsbedingungen, regelmäßiger Austausch der Zellkulturmedien, wachstumsabhängige Passagierung mit erneuter Aussaat definierter Zellzahlen). Zur Beschreibung des Wachstumsverhaltens der Zellen wurden im Laufe der Passagierung nicht nur RNA-Proben gewonnen, sondern auch die KPD mit Hilfe mikroskopisch bestimmter Zellzahlen ermittelt. Die optische Auswertung unter Verwendung einer Zählkammer erscheint angesichts bereits verfügbarer technischer Zählgeräte ungenau, konnte jedoch durch Mittelung mehrerer Zählergebnisse zufriedenstellend angewendet werden.

Die artifizielle adipogene und osteogene Differenzierung der Zellen wurde mit etablierten Medienzusätzen über einen festgelegten Zeitraum durchgeführt. Außerdem wurden Kontrollproben als Refe-

renz für die spätere Auswertung parallel kultiviert. Neben der Gewinnung von RNA-Proben wurden spezifische Färbungen durchgeführt, mit denen die erfolgreiche Differenzierung zusätzlich beurteilt werden konnte (s. 5.2.4).

### 5.2.3. mRNA-Quantifizierung

Die Isolierung der gesamt RNA wurde mittels eines kommerziellen Kits (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Kit von Machery-Nagel) unter strenger Befolgung der einzelnen Arbeitsanweisungen durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Fremdmaterialien und Nukleasen wurden beim Umgang mit den Proben stets Handschuhe und sterile (Verbrauchs)materialien (Filterpipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Reagenzien) verwendet. Methodenbedingt musste die mRNA in einem weiteren Schritt zunächst in cDNA umgeschrieben werden (reverse Transkription). Hierbei handelt es sich um einen kritischen Schritt in der Quantifizierung von mRNA, da die Effizienz der ablaufenden enzymatischen Reaktion unbekannt ist. Außerdem ist die gebildete cDNA-Produktmenge (Ausgangsmaterial für die weitere Amplifikation) von der zuvor photometrisch bestimmten Ausgangskonzentration/-menge abhängig. Als mögliche Fehlerquelle können somit neben Pipettierungsungenauigkeiten auch Messfehler in der Konzentrationsbestimmung Auswirkungen auf die Quantifizierung haben.

Bei der semiquantitativen PCR handelt es sich um eine etablierte Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Bei der Durchführung wurden sämtliche Lösungen und Proben auf Eis verarbeitet, um mögliche enzymatische Reaktionen vor dem definierten PCR-Durchlauf zu minimieren. Die primerspezifischen Parameter der PCR (Zykluszahl, Annealing-Temperatur, MgCl<sub>2</sub>-Konzentration) wurden individuell ermittelt, um eine optimierte Vervielfältigung zu erreichen. Insbesondere die Zyklusanzahl musste so angepasst werden, dass die Amplifikation im linearen Bereich der Reaktion stattfand und die anschließende Quantifizierung (s. unten) somit nicht die Plateauphase abbildete. Mögliche Verunreinigungen der Proben wurde durch zusätzliche Negativkontrollen ausgeschlossen. Die anschließende Gelelektrophorese diente zur Auftrennung der gebildeten Nukleinsäuresequenzen. Zur Beurteilung der Genprodukt-Größe und damit der Spezifität der abgelaufenen PCR konnte das entstehende Bandenmuster mit Hilfe einer zusätzlich mitlaufenden DNA-Leiter referenziert werden. Die Auswertung der Bandenmuster (densitometrische Quantifizierung) erfolgte softwaregestützt unter Verwendung der mittels Fluoreszenzsystem gemachten Aufnahmen. Zur Normierung wurde hierbei ein Housekeeping-Gen verwendet, dessen Expression als stabil beschrieben ist.

Die qPCR gilt als sensitive und genaue Methode zur Quantifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten. Auch hierbei musste die vorliegende Proben-RNA zunächst isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend die qPCR mit einem entsprechenden Reaktionsmix durchgeführt werden (Ablauf s. oben). Für die Auswertung wurde das Effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell abgeleitet von der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewendet (Pfaffl, 2001). Hierbei werden neben den experimentell ermittelten Ct-Werten auch die Effizienzen der zugrundeliegenden (genspezifischen) Kettenreaktionen benötigt. Diese müssen für die verschiedenen Gene zuvor durch Standardkurven mittels unterschiedlicher Verdünnungsstufen bestimmt werden. Dieser Mehraufwand führt allerdings zur realitätsnäheren Beschreibung der tatsächlich ablaufenden Reaktion und ermöglicht somit eine genauere Interpretation. Um die Spezifität der abgelaufenen qPCR zu kontrollieren, wurden zum einen

Negativkontrollen verwendet und zum anderen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Außerdem wurden für jedes Gen drei Testansätze ausgewertet, um mögliche Messabweichungen aufgrund von Pipettierungsungenauigkeiten zu minimieren. Die Verwendung von Housekeeping-Genen diente der Normierung der ermittelten Messwerte.

#### **5.2.4. Differenzierungsspezifische Färbungen und deren Auswertung**

Die Färbung der adipogen, osteogen oder undifferenzierten Proben fand nach entsprechender Fixierung protokollgemäß statt. Hierbei wurden für die jeweilige Differenzierung klassische Strukturen (adipogen: Lipidtropfen, osteogen: Kalziumhydrogenphosphat) angefärbt. Die digitale (softwaregestützte) Auswertung wurde anhand von mehreren, repräsentativen Bildausschnitten durchgeführt und ermittelte den differenzierungsspezifisch gefärbten Flächenanteil in Relation zur Gesamtfläche. Anhand der undifferenzierten Kontrollproben konnte die erfolgreiche Differenzierung (Anfärbbarkeit) der Zielstrukturen verifiziert werden. Alternativ kann zur Quantifizierung im Rahmen der adipogenen Differenzierung z.B. ein Adipogenesis-Assay angewendet werden. Hierbei wird die Menge des in den Lipidtropfen gebildeten Fettes nach Herauslösen des Ölrot O-Farbstoffes durch eine photometrische Absorptionsmessung bestimmt (Kraus et al., 2016). Auch die Menge des bei der osteogenen Differenzierung gefärbten Kalziumhydrogenphosphates kann indirekt bestimmt werden. Hierzu wird der zuvor gebundene Alizarin Rot S-Farbstoff herausgelöst und anschließend photometrisch quantifiziert (Stanford et al., 1995). Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch zunächst die Beurteilung eines möglichen qualitativen Unterschiedes zwischen den beiden Spender-Gruppen ermöglicht werden sollte, wurde auf die Anwendung dieser präziseren Methoden verzichtet.

### **5.3. Diskussion der Ergebnisse**

#### **5.3.1. Wechselpender-hMSC besitzen tendenziell eine eingeschränkte Proliferationskapazität**

Um die Proliferationskapazität der hMSC der beiden Gruppen zu beurteilen, wurde das Wachstumsverhalten in Kultur analysiert. Hierbei erreichten die Wechselpender-hMSC bis zum Eintritt des Proliferationsstopps eine geringere Anzahl an KPD (s. Abb. 4.1 B). Außerdem trat nach einer geringeren Anzahl von Passagen und einer kürzeren Kulturdauer (in Tagen) der Proliferationsstopp ein (s. Abb. 4.2 B und C). Somit war das Verdopplungspotential und die Zeitspanne, in der die Zellen durch Zellteilung zur Erneuerung und Regeneration des Gewebes beitragen können, reduziert. Da die festgestellten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen statistisch nicht signifikant waren, kann mit Hilfe der erhobenen Daten die Hypothese eines Proliferationsdefizites der Wechselpender-hMSC zwar nicht bestätigt werden. Allerdings zeigt die Ausprägung der Wachstumspotential-Parameter konsequent eine Tendenz eingeschränkter Proliferationskapazität an.

Ein Faktor, der in diesem Zusammenhang als möglicher Grund für das reduzierte Wachstumspotential angeführt werden kann, ist das Spenderalter. Allerdings zeigten die beiden Gruppen keinen signifikanten Altersunterschied (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung: Kontrollspender vs. Wechsel-

spender:  $65 \pm 11$  Jahre vs.  $70 \pm 7$  Jahre). Außerdem konnte bereits in einer anderen Studie gezeigt werden, dass die Effizienz der Kolonie-Bildung durch hMSC nicht vom Alter des Spenders abhängt (Stenderup et al., 2001). In einer wichtigen Referenzstudie zum Thema der Rolle von hMSC im Rahmen von Prothesenlockerungen wurde u.a. die Selbsterneuerungskapazität untersucht. Hierbei wurde diese Eigenschaft durch die Anzahl gebildeter Zell-Kolonien in einem sog. CFU-F (colony-forming unit fibroblasts) assay beurteilt. Die hMSC von Revisionsoperations-Spendern zeigten dabei 63,9% weniger Zell-Kolonien als die hMSC von Kontrollspendern (diese wurden von Patienten, die sich einer elektiven primären Prothesenimplantation unterzogen hatten, gewonnen). Dies wurde als Einschränkung des Selbsterneuerungspotentials gedeutet (Margulies et al., 2015) und steht somit nicht im Widerspruch zu den als Tendenz beobachteten Ausprägungen dieser Untersuchungsreihe. Zu beachten ist jedoch, dass die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Wachstumseigenschaften (Wachstumskinetik, KPD) alternative Parameter zur Beschreibung des Selbsterneuerungspotentials waren. Sie wurden im Verlauf der Kultivierung erhoben und spiegeln somit den zeitlichen Verlauf dieser Zelleigenschaft wider. Hingegen handelt es sich bei der Auswertung von gebildeten Zellkolonien zu einem definierten Zeitpunkt um die momentane Ausprägung, die als Prädiktor für das zukünftige Zellverhalten postuliert wird.

### 5.3.2. Wechselspender-hMSC besitzen eine proinflammatorische Prägung

Die Auswertung der Genexpression zu Beginn der Kultivierung (Passage P1) zeigte, dass bezüglich sämtlicher Seneszenz-assoziiierter Marker (SAA1, SAA2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) das Expressionsniveau der Wechselspender-hMSC höher war (s. Abb. 4.3). Es handelte sich hierbei um die Betrachtung einer Relation, sodass die Zahlenwerte das Vielfache der Expression gegenüber der Referenz (Expression der Kontrollspender-hMSC) widerspiegeln. Signifikante Unterschiede zeigten sich hierbei lediglich für SAA1 und IL-1 $\beta$ , was sich v.a. aus der hohen Spendervariabilität der Messwerte ergab. Dennoch lässt sich hieraus ableiten, dass bei den Wechselspender-hMSC bereits am Anfang eine proinflammatorische Prägung vorlag.

### 5.3.3. Langzeitkultivierung führt zur Ausbildung eines Seneszenz-assoziierten proinflammatorischen Phänotyps

Um die Vergleichbarkeit der individuellen Alterungsprozesse der verschiedenen Zellpräparationen zu gewährleisten, wurde die Kultivierungsdauer in Anlehnung an (Ebert et al., 2015) in Quartale eingeteilt. Die Auswertung der relativen Genexpression Seneszenz-assoziiierter Marker (SAA1, SAA2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) im Verlauf der *in vitro* Kultivierung wurde dementsprechend zu definierten Zeitpunkten durchgeführt. Eine alternative Möglichkeit der Einteilung besteht gemäß (Ren et al., 2013) darin, das individuelle hMSC-Alter anhand des prozentualen Anteiles der KPD in einer bestimmten Passage an der maximalen KPD (zum Zeitpunkt des Proliferationsstopps) zu bestimmen. Es konnte ein charakteristischer, phasenhafter Verlauf der Genexpression von SAA1 und SAA2 nachgewiesen werden: zunächst kam es zu einem kontinuierlichem Anstieg der Genexpression (Maximum in Passage P1+n2 bzw. P1+n3) und anschließend zu einem Abfall (s. Abb. 4.4). Dies wurde bereits im

Rahmen einer Untersuchung zum Einfluss von Serum Amyloid A Proteinen auf hMSC gezeigt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die kodierenden Gene SAA1 und SAA2 zum einen lokal in hMSC exprimiert wurden und dass sich ihre Expression zum anderen durch eine *in vitro* Alterung verstärkte. Außerdem führte die Bindung an TLR4 (Toll-like receptor 4) zur selbsterhaltenden proinflammatorischen Amplifikation (Ebert et al., 2015). Bezüglich der immunmodulatorischen Cytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 konnte eine Zunahme der Expression im Verlauf der Kultivierung festgestellt werden (s. Abb. 4.5). Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass es tatsächlich zur Ausbildung eines SASP gekommen war. Insbesondere für IL-1 $\beta$  zeigten sich große Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen, die jedoch kein signifikantes Niveau erreichten. Dies kann möglicherweise auf die geringe Probengröße und die Heterogenität der einzelnen Spender-Messwerte in Kombination mit dem sehr sensitiven Verfahren der qPCR zurückgeführt werden. Eventuell wäre durch eine Erhöhung der Spenderzahl eine Minimierung der großen Fehlerbalken möglich. Außerdem ist methodenbedingt zu beachten, dass sich diese relativen Expressionswerte stets auf die Referenz-Expression in Passage P1 bezogen. Da für diese bereits ein höheres Expressionsniveau der Wechselspender-hMSC gezeigt wurde (s. 5.3.2), müssen die dargestellten Differenzen relativiert werden.

#### 5.3.4. Seneszenzentwicklung hat keinen Einfluss auf den Stammzellcharakter

Im Verlauf der *in vitro* Alterung zeigte die densitometrische Auswertung der semiquantitativen PCR Produkte eine Zunahmetendenz der Seneszenzmarker p16 (Bringold et al., 2000) und PSG5 (Endoh et al., 2009) (s. Abb. 4.5). Dies diente als Nachweis für die Ausbildung eines seneszenten Zustandes (neben dem beobachteten Wachstumsarrest). Hierbei konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den beiden hMSC-Gruppen (insbesondere in der seneszenten Passage Ps) festgestellt werden. Somit war die Seneszenzentwicklung (bezogen auf den individuellen Alterungsprozess der jeweiligen Zell-Präparation) gleichartig und die Hypothese eines schnelleren Alterungsprozesses der Wechselspender-hMSC konnte nicht bestätigt werden. Die beobachtete Expressionsabnahme beider Marker der Wechselspender-hMSC zwischen Passage P1+n2 und Passage P1+n3 war möglicherweise kulturtechnisch durch Verlust seneszenten Zellen im Rahmen der Passagierung bedingt. Dennoch blieb der Expressionszunahmetrend als Seneszenznachweis erhalten. Auch der Stammzellmarker Oct4 (der in embryonalen Stammzellen zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz notwendig ist (Nichols et al., 1998)) zeigte im Verlauf der Kultivierung eine gering ausgeprägte Zunahmetendenz (s. Abb. 4.5). Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden hMSC-Gruppen festgestellt. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die hMSC beider Gruppen ihren Stammzellcharakter im Rahmen der Seneszenzentwicklung aufrecht erhielten.

#### 5.3.5. Wechselspender-hMSC weisen tendenziell ein adipogenes Differenzierungsdefizit auf

Die Auswertung der Genexpression während der adipogenen Differenzierung zeigte, dass bezüglich sämtlicher Marker (FABP4, LPL, PPAR $\gamma$ 2) (Pittenger et al., 1999) ein signifikant höheres Expressionsniveau der Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu den Wechselspender-hMSC vorlag (s. Abb. 4.6).

Zu berücksichtigen ist an dieser Stelle, dass aufgrund der fehlenden Expression der betrachteten Marker in den jeweiligen undifferenzierten Kontrollproben die Ermittlung einer relativen Vervielfältigung (Fold Change, s. 3.2.7) nicht möglich war. Daher wurde eine alternative Maßzahl definiert (Intensitätsverhältnis des adipogenen Markers zum zugehörigen Haushaltsgen in der entsprechenden adipogen differenzierten Probe), die zum Vergleich der beiden Gruppen herangezogen wurde. Die anschauliche quantitative Interpretation der Zahlenwerte als relative Vervielfältigung der Genexpression im Zuge der Differenzierung war somit nicht möglich - die Ableitung der qualitativen Aussage, dass die Wechselspender-hMSC im Vergleich eine geringere Genexpression aufwiesen, hingegen schon. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit denen von (Margulies et al., 2015), die im Rahmen einer adipogenen Differenzierung von hMSC eine signifikant geringere FABP4-Expression von Revisions Spendern im Vergleich zu Kontroll Spendern nachweisen konnten. Zusätzlich zeigten die Revisions-hMSC in dieser Studie nach Zugabe eines adipogenen Differenzierungsmediums eine geringere Anzahl an Adipozyten als weiteres Indiz für ein adipogenes Differenzierungsdefizit.

Die Ölrot O-Färbung intrazellulärer Lipidvesikel wies zum einen die erfolgreiche adipogene Differenzierung nach. Zum anderen zeigte die softwaregestützte Quantifizierung, dass die Wechselspender-hMSC eine geringere Differenzierungskapazität besaßen (s. Abb. 4.7). Dieser festgestellte Mittelwertsunterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Zusammengefasst lieferten die beiden unterschiedlichen experimentellen Nachweismethoden für die adipogene Differenzierung somit diskrepante Ergebnisse. Zwar konnte mit Hilfe der Färbung eine mit der Genexpressionsanalyse gleichsinnige Ausprägung eines adipogenen Differenzierungsdefizites der Wechselspender-hMSC festgestellt werden. Aufgrund der Variabilität der einzelnen Werte konnte hierbei jedoch kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Somit können die Ergebnisse lediglich als Tendenz einer eingeschränkten adipogenen Differenzierungsfähigkeit gedeutet werden.

### 5.3.6. Wechselspender-hMSC weisen tendenziell ein osteogenes Differenzierungsdefizit auf

Nach Abschluss der osteogenen in vitro Differenzierung zeigte die Auswertung der Genexpression, dass bezüglich sämtlicher Osteoblasten-Marker (ALP, OC, OP) (Noth et al., 2002) ein höheres Expressionniveau der Kontrollspender-hMSC im Vergleich zu den Wechselspender-hMSC vorlag (s. Abb. 4.8). Die ermittelten Werte für den Fold Change zeigten sowohl für ALP als auch für OP eine Zunahme der Genexpression im Zuge der osteogenen Differenzierung (Fold Change > 1). Für den Mineralisierungsinhibitor OC hingegen wurde eine Abnahme der Genexpression festgestellt (Fold Change < 1). Ebenso konnten (Margulies et al., 2015) eine signifikant verringerte OC Expression von Revisionsoperations-hMSC gegenüber Kontroll-hMSC feststellen. Außerdem zeigten Revisions-hMSC im Rahmen der Differenzierung auch eine Abnahme des Expressionsniveaus dieses Markers (Fold Change < 1). Die gefundenen Expressions-Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren statistisch nicht signifikant, sodass die Hypothese eines osteogenen Differenzierungsdefizites an dieser Stelle nicht bestätigt werden kann. Als Limitation ist insbesondere die geringe Probenanzahl zu erwähnen, die einen möglicherweise tatsächlich vorliegenden Expressionsunterschied verschleiert haben könnte.

Die Alizarin Rot S-Färbung der mineralisierten Extrazellulärmatrix wies zum einen die erfolgreiche osteogene Differenzierung nach. Zum anderen zeigte die softwaregestützte Quantifizierung, dass die Wechselpender-hMSC eine geringere Differenzierungskapazität besaßen (s. Abb. 4.9). Dieser festgestellte Mittelwertsunterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Zusammengefasst lieferten die beiden unterschiedlichen experimentellen Nachweismethoden für die osteogene Differenzierung somit keinen signifikanten Hinweis für ein osteogenes Differenzierungsdefizit sondern lediglich eine Tendenz in diese Richtung. Dies steht somit nicht im Widerspruch mit den Ergebnissen von (Margulies et al., 2015). Dabei wurde das Auftreten von signifikant weniger ALP-positiven Kolonien und die reduzierte Mineralisation im Rahmen einer osteogenen Differenzierung als osteogenes Defizit der Revisionsoperations-hMSC gewertet.

## **5.4. Ausblick**

Die experimentell erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die hMSC von Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung eine tendenziell geringere regenerative Kapazität als Vergleichs-hMSC aufwiesen. Dies kann als Indiz für eine Beteiligung dieser Zellen im Rahmen eines solchen Lockerungsprozesses gedeutet werden. Ob die eingeschränkten Zellfunktionen jedoch Ursache oder Folge dieses Verbindungsverlustes von Implantat und Knochen ist, kann mit den beschriebenen Daten nicht beurteilt werden. Nötig sind daher weitere (prospektive) Untersuchungen der Eigenschaften der hMSC-Nische z.B. zum Zeitpunkt der primären Prothesenimplantation, um einen möglichen kausalen Zusammenhang mit dem Auftreten einer späteren aseptischen Lockerung zu bestätigen oder zu negieren. Zukünftig könnten dann anhand der regenerativen Kapazität der hMSC-Nische eines Patienten mögliche Prädiktoren abgeleitet werden, mit deren Hilfe das Risiko für eine spätere Prothesenlockerung abgeschätzt werden kann. Als klinische Anwendung wäre z.B. ein intraoperativer Schnelltest der patienteneigenen hMSC-Nische denkbar, aus deren Ergebnis sich Konsequenzen für die primäre Prothesenversorgung (z.B. Auswahl des Prothesenmaterials und dessen Beschichtung, Art der Verankerung: zementiert vs. nicht-zementiert, Operationstechnik) ergeben. Aber auch im Rahmen einer bereits eingetretenen Lockerung könnte z.B. eine gezielte (medikamentöse) Beeinflussung genutzt werden, um diese regenerativen Zelleigenschaften aufrechtzuerhalten bzw. wiederherzustellen. All dies könnte das Ergebnis einer Revisions-Operation verbessern und so dem Wohle des Patienten zu Gute kommen.

## 6. Zusammenfassung

Trotz ständiger Weiterentwicklung der modernen Endoprothetik (z.B. auf dem Gebiet verwendeter Materialien) weist ein künstliches Gelenk auch heute noch eine begrenzte Haltbarkeit auf. Insbesondere die Versorgung jüngerer (aktiver) Patienten führt in Kombination mit der steigenden Lebenserwartung dazu, dass immer öfter die Prothesenstandzeit aufgebraucht und ein komplizierter Revisionseingriff notwendig wird. Hierbei ist die aseptische Prothesenlockerung der häufigste Grund für den Austausch eines Implantates (bei Hüft- und Kniegelenksendoprothesen). Es kommt zu einem Verbindungsverlust zwischen Implantat und umgebenden Knochen, was zu klinischen Symptomen führen kann (vorrangig Schmerzen). Das Knochenmark des betreffenden Knochens enthält humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC), die zur Aufrechterhaltung und Regeneration des Bindegewebes u.a. des Knochens selbst beitragen. Ob diese Zellen z.B. durch ein Proliferations- oder Differenzierungsdefizit eine Rolle in der Ätiologie einer aseptischen Prothesenlockerung spielen, ist bisher nicht abschließend geklärt. Daher erscheint die Untersuchung eines möglichen kausalen Zusammenhanges im Sinne des Patientenwohles von hoher (klinischer) Relevanz.

In der vorliegenden Arbeit wurde die regenerative Kapazität von hMSC von zwei Spendergruppen untersucht und verglichen: Als Wechselgruppe dienten Patienten, bei denen es zu einer aseptischen Prothesenlockerung und der Notwendigkeit eines Revisionseingriffes (Wechseloperation) gekommen war. Patienten, denen primär eine Hüft- oder Kniegelenksendoprothese eingesetzt wurde, bildeten die Kontrollgruppe. Zur Beurteilung der Eigenschaften der hMSC wurde zum einen das Wachstums- und Alterungsverhalten in Kultur zum anderen die *in vitro* Differenzierungskapazität untersucht.

Die Auswertung des Wachstumsverhaltens der beiden Gruppen zeigte, dass die Wechselspender-hMSC eine tendenziell geringere Proliferationskapazität als die Kontrollspender-hMSC aufwiesen (geringere Anzahl an Tagen und Passagen bis zum Erreichen des Proliferationsstopps, geringere Gesamtkumulative-Populationsverdopplung). Bereits zu Beginn der Kultivierung (Passage P1) war eine erhöhte relative Expression der untersuchten Seneszenz-assoziierten Marker (SAA1, SAA2, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) der Wechselspender-hMSC in Relation zu den Kontrollspender-hMSC als Hinweis auf eine proinflammatorische Prägung nachweisbar. Außerdem konnte anhand des Verlaufs dieser Marker die gruppengleiche Ausbildung eines Seneszenz-assoziierten proinflammatorischen Phänotyps (SASP) beobachtet werden. Weitere Stammzell- und Seneszenz-assoziierte Marker (Oct4, p16, PSG5) zeigten die Entwicklung einer zellulären Seneszenz und die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters während des Zellalterungsprozesses an. Im Rahmen der *in vitro* Differenzierung konnte der Trend einer geringeren Expression adipogener (FABP4, LPL, PPAR $\gamma$ 2) und osteogener Marker (ALP, OC, OP) von Wechselspender-hMSC nachgewiesen werden. Auch die Quantifizierung spezifischer Färbungen ließ eine Neigung in Richtung eines Differenzierungsdefizit erkennen, welches sich jedoch nicht als statistisch signifikant darstellte.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit die Erkenntnis, dass die regenerative Kapazität von hMSC von Patienten mit einer aseptischen Prothesenlockerung im Vergleich zu Kontroll-Patienten tendenziell geringer ausfällt. Dies kann als Ursache aber auch als Folge eines solchen Lockerungsprozesses gewertet werden. Somit dienen die gewonnenen Ergebnisse als Grundlage für weiterführende Untersuchungen, die den Stellenwert von hMSC bei der Ausbildung einer aseptischen Prothesenlockerung beleuchten.

## 7. Literaturverzeichnis

- Bringold, F. und M. Serrano. „Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence“. In: *Exp Gerontol* 35.3 (2000), S. 317–329.
- Bruder, S. P., N. Jaiswal und S. E. Haynesworth. „Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation“. In: *J Cell Biochem* 64.2 (1997), S. 278–294.
- Caplan, A. I. „Mesenchymal stem cells“. In: *J Orthop Res* 9.5 (1991), S. 641–650.
- Chamberlain, G. et al. „Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing“. In: *Stem Cells* 25.11 (2007), S. 2739–2749.
- Chen, Q. et al. „Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92.10 (1995), S. 4337–4341.
- Coppé, J. P. et al. „Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor“. In: *PLoS Biol* 6.12 (2008), S. 2853–2868.
- Coppé, J. P. et al. „The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression“. In: *Annu Rev Pathol* 5 (2010), S. 99–118.
- Cristofalo, V. J. et al. „Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts“. In: *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8.1 (1998), S. 43–80.
- De Bari, C., T. B. Kurth und A. Augello. „Mesenchymal stem cells from development to postnatal joint homeostasis, aging, and disease“. In: *Birth Defects Res C Embryo Today* 90.4 (2010), S. 257–271.
- De Ugarte, D. A. et al. „Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow“. In: *Cells Tissues Organs* 174.3 (2003), S. 101–109.
- Dimri, G. P. et al. „A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92.20 (1995), S. 9363–9367.
- Dominici, M. et al. „Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement“. In: *Cytotherapy* 8.4 (2006), S. 315–317.
- Ebert, R. et al. „Acute phase serum amyloid A induces proinflammatory cytokines and mineralization via toll-like receptor 4 in mesenchymal stem cells“. In: *Stem Cell Res* 15.1 (2015), S. 231–239.

- Endoh, M. et al. „Coordinate expression of the human pregnancy-specific glycoprotein gene family during induced and replicative senescence“. In: *Biogerontology* 10.2 (2009), S. 213–221.
- Firth, Amy L., Weijuan Yao und Jason X.-J. Yuan. „Identification of Adult Stem and Progenitor Cells in the Pulmonary Vasculature“. In: *Textbook of Pulmonary Vascular Disease*. Hrsg. von Jason X. J. Yuan et al. Boston, MA: Springer US, 2011, S. 621–636. ISBN: 978-0-387-87429-6.
- Gallo, J. et al. *Aseptic Loosening of Total Hip Arthroplasty as a Result of Local Failure of Tissue Homeostasis*. Recent Advances in Arthroplasty. InTech Europe, Rijeka, 2012. ISBN: 978-953-307-990-5.
- Gerstenfeld, L. C. et al. „Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation“. In: *J Cell Biochem* 88.5 (2003), S. 873–884.
- Harley, C. B. „Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?“ In: *Mutat Res* 256.2-6 (1991), S. 271–282.
- Hayflick, L. und P. S. Moorhead. „The serial cultivation of human diploid cell strains“. In: *Exp Cell Res* 25 (1961), S. 585–621.
- Iamthanaporn, K., K. Chareancholvanich und C. Pornrattanamaneewong. „Revision primary total hip replacement: causes and risk factors“. In: *J Med Assoc Thai* 98.1 (2015), S. 93–99.
- Jaiswal, N. et al. „Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro“. In: *J Cell Biochem* 64.2 (1997), S. 295–312.
- Johnstone, B. et al. „In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells“. In: *Exp Cell Res* 238.1 (1998), S. 265–272.
- Kalinina, N. I. et al. „Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair“. In: *Acta Naturae* 3.4 (2011), S. 30–37.
- Katzer, A. und J. F. Löhr. „Frühlockerung von Hüftgelenkendoprothesen“. In: *Dtsch Arztebl* 100.12 (2003), S. 784–790.
- Kraus, N. A. et al. „Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture“. In: *Adipocyte* 5.4 (2016), S. 351–358.
- Lee, O. K. et al. „Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood“. In: *Blood* 103.5 (2004), S. 1669–1675.
- Loi, F. et al. „Inflammation, Fracture and Bone Repair“. In: *Bone* 86 (2016), S. 119–130.

- Lombardi A. V., Jr., K. R. Berend und J. B. Adams. „Why knee replacements fail in 2013: patient, surgeon, or implant?“ In: *Bone Joint J* 96-B.11 Supple A (2014), S. 101–104.
- Margulies, B. S. et al. „Functionally deficient mesenchymal stem cells reside in the bone marrow niche with M2-macrophages and amyloid-beta protein adjacent to loose total joint implants“. In: *J Orthop Res* 33.5 (2015), S. 615–624.
- Narkbunnam, R. und K. Chareancholvanich. „Causes of failure in total knee arthroplasty“. In: *J Med Assoc Thai* 95.5 (2012), S. 667–673.
- Nichols, J. et al. „Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4“. In: *Cell* 95.3 (1998), S. 379–391.
- Noth, U. et al. „Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells“. In: *J Orthop Res* 20.5 (2002), S. 1060–1069.
- OECD. „Health at a Glance 2013“. In: Paris: OECD Publishing, 2013. Kap. Hip and knee replacement, S. 96–97. ISBN: 9789264200715.
- Pajarinen, J. et al. „Mesenchymal stem cells in the aseptic loosening of total joint replacements“. In: *J Biomed Mater Res A* 105.4 (2017), S. 1195–1207.
- Perka, Carsten et al. „Revisionsendoprothetik“. In: *AE-Manual der Endoprothetik: Hüfte und Hüftrevision*. Hrsg. von Lutz Claes et al. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, S. 441–587. ISBN: 978-3-642-14646-6.
- Peters, K. M., M. E. Fritzen und B. Klosterhalfen. *Fortbildung Osteologie 2*. Fortbildung Osteologie. Steinkopff Verlag, 2008. ISBN: 978-3-7985-1824-7.
- Pfaffl, M. W. „A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR“. In: *Nucleic Acids Res* 29.9 (2001), e45.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan und L. Dempfle. „Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR“. In: *Nucleic Acids Res* 30.9 (2002), e36.
- Pittenger, M. F. et al. „Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells“. In: *Science* 284.5411 (1999), S. 143–147.
- Prieur, A. et al. „p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression“. In: *Nat Commun* 2 (2011), S. 473.
- Rabenberg, Martina. *Arthrose*. 2013. URL: [https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/arthrose.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/arthrose.pdf?__blob=publicationFile) (besucht am 06.08.2015).

- Ren, J. et al. „Intra-subject variability in human bone marrow stromal cell (BMSC) replicative senescence: molecular changes associated with BMSC senescence“. In: *Stem Cell Res* 11.3 (2013), S. 1060–1073.
- Schroer, W. C. et al. „Why are total knees failing today? Etiology of total knee revision in 2010 and 2011“. In: *J Arthroplasty* 28.8 Suppl (2013), S. 116–119.
- Sedelnikova, O. A. et al. „Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks“. In: *Nat Cell Biol* 6.2 (2004), S. 168–170.
- Serrano, M. et al. „Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a“. In: *Cell* 88.5 (1997), S. 593–602.
- Sethe, S., A. Scutt und A. Stolzing. „Aging of mesenchymal stem cells“. In: *Ageing Res Rev* 5.1 (2006), S. 91–116.
- Sharkey, P. F. et al. „Why are total knee arthroplasties failing today—has anything changed after 10 years?“ In: *J Arthroplasty* 29.9 (2014), S. 1774–1778.
- Shay, J. W. und W. E. Wright. „Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase“. In: *Carcinogenesis* 26.5 (2005), S. 867–874.
- Stanford, C. M. et al. „Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP)“. In: *J Biol Chem* 270.16 (1995), S. 9420–9428.
- Stenderup, K. et al. „Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells“. In: *Bone* 33.6 (2003), S. 919–926.
- Stenderup, K. et al. „Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis“. In: *J Bone Miner Res* 16.6 (2001), S. 1120–1129.
- Stürz, H. *Der Wechsel von künstlichen Gelenken - ein Thema mit zunehmender Brisanz!* 2009. URL: [http://www.ukgm.de/ugm\\_2/deu/ugm\\_gfu/PDF/Aseptische\\_Prothesenwechsel.pdf](http://www.ukgm.de/ugm_2/deu/ugm_gfu/PDF/Aseptische_Prothesenwechsel.pdf) (besucht am 18.05.2015).
- Sundfeldt, M. et al. „Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories“. In: *Acta Orthop* 77.2 (2006), S. 177–197.
- Thiele, K. et al. „Current failure mechanisms after knee arthroplasty have changed: polyethylene wear is less common in revision surgery“. In: *J Bone Joint Surg Am* 97.9 (2015), S. 715–720.
- Wengler, Annelene, Ulrike Nimptsch und Thomas Mansky. „Hüft- und Kniegelenkersatz in Deutschland und den USA: Auswertung deutscher und US-amerikanischer

- Krankenhauseinzelfalldaten von 2005 bis 2011“. In: *Dtsch Arztebl International* 111.23-24 (2014), S. 407–416.
- Wirtz, D.C., C. Rader und H. Reichel. *Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne*. Springer Berlin Heidelberg, 2008. ISBN: 978-3-540-75648-4.
- Young, H. E. et al. „Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs“. In: *Dev Dyn* 202.2 (1995), S. 137–144.

## A. Abkürzungen

---

Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
ALP	Alkalische Phosphatase
a.p.	anterior posterior
as	antisense
AZ	Aktenzeichen
bp	Basenpaar
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
BV	Besloten vennootschap met beperkte aansprakelijkheid (niederländische Gesellschaft mit beschränkter Haftung)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA (deutsch: komplementäre DNA)
CFU-F	colony-forming unit fibroblasts
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
Co. Ltd.	company limited
COX4I1	Cytochrom c oxidase subunit 4 isoform 1
CRP	C-reaktives Protein
Ct	threshold cycle
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E</i>	Effizienz
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEF1a1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
et al.	et alii (deutsch: und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
FABP4	Fatty acid binding protein 4
FCS	Fetal Calf Serum (deutsch: fetales Kälberserum)

---

---

for	forward
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
Hess.	Hessisch
HGF	Hepatocyte growth/scatter factor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HPLC	High-performance liquid chromatography
Hrsg.	Herausgeber
ICAM	Intracellular adhesion molecules
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding proteins
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ISBN	Internationale Standardbuchnummer
kb	Kilo-Basenpaar
KCl	Kaliumchlorid
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KPD	kumulative Populationsverdopplung
l	Liter
log	Logarithmus
LPL	Lipoprotein Lipase
m	Masse
M	Molar
<i>m</i>	Steigung
m.	männlich
mbH	mit beschränkter Haftung
MCP 2	Monocyte chemoattractant protein 2 (CCL8: Chemokine ligand 8)
MDB	Membrane Desalting Buffer
MeSH	Medical Subject Headings
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mM	Millimolar

---

mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymal Stem Cell (deutsch: Mesenchymale Stammzelle)
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
OC	Osteocalcin (Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (BGLAP))
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (deutsch: Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung)
OP	Osteopontin (Secreted phosphoprotein 1 (SPP1))
P1+n1	Passage am Ende des ersten Quartals
P1+n2	Passage am Ende des zweiten Quartals
P1+n3	Passage am Ende des dritten Quartals
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction (deutsch: Polymerase Kettenreaktion)
PD	Populationsverdopplung
pH	potentia Hydrogenii
pM	Pikomolar
PPAR $\gamma$ 2	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2
Prof.	Professor
Ps	seneszente Passage (Proliferationsstopp)
Ps-1	vorletzte Passage vor dem Proliferationsstopp
PSG5	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5
Px	untersuchte Passage
qfor	forward
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction (deutsch: quantitative Polymerase Kettenreaktion)
qrev	reverse
®	Registered Trade Mark
rDNase	rekombinante DNase
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure

---

---

rpm	revolutions per minute (deutsch: Umdrehungen pro Minute)
RPS27A	Ribosomal Protein S27a
RT	Reverse Transkription
s	sense
s.	siehe
S.	Seite
SAA1	Serum Amyloid A 1
SAA2	Serum Amyloid A 2
SASP	senescence-associated secretory phenotype (deutsch: Seneszenz-assoziiertes proinflammatorisches Phänotyp)
sek	Sekunde
sog.	sogenannt
$T_A$	Annealing Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TEP	Totalendoprothese
TLR	Toll-like receptor
<sup>TM</sup>	Trademark
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
USA	United States of America (deutsch: Vereinigte Staaten von Amerika)
UV	Ultraviolett
u.a.	unter anderen/unter anderem
u.U.	unter Umständen
V	Volt
vs.	versus
w.	weiblich
WHO	World Health Organisation (deutsch: Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel
$\emptyset$	Durchschnitt
°C	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
%	Prozent

---

## B. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Bildgebung bei einer Prothesenlockerung . . . . .	4
Abb. 1.2	Übersicht über verschiedene Differenzierungswege von Mesenchymalen Stammzellen	6
Abb. 4.1	Auswertung der kumulativen Populationsverdopplung . . . . .	32
Abb. 4.2	Auswertung des Wachstumsverhaltens . . . . .	33
Abb. 4.3	Auswertung der relativen Expression Seneszenz-assoziiierter Marker in Passage P1	35
Abb. 4.4	Auswertung der relativen Expression Seneszenz-assoziiierter Marker im Verlauf der in vitro Kultivierung . . . . .	36
Abb. 4.5	Auswertung der relativen Expression Stammzell- und Seneszenz-assoziiierter Mar- ker im Verlauf der in vitro Kultivierung . . . . .	38
Abb. 4.6	Auswertung der Expressionsstärke klassischer Marker bei adipogener Differenzierung	40
Abb. 4.7	Auswertung der Ölrot O-Färbung bei adipogener Differenzierung . . . . .	41
Abb. 4.8	Auswertung der Expressionsstärke klassischer Marker bei osteogener Differenzierung	42
Abb. 4.9	Auswertung der Alizarin Rot S-Färbung bei osteogener Differenzierung . . . . .	43

## C. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Verwendete Geräte . . . . .	10
Tab. 2.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien . . . . .	11
Tab. 2.3	Verwendete Chemikalien und Reagenzien . . . . .	12
Tab. 2.4	Verwendete Enzyme . . . . .	13
Tab. 2.5	Verwendete Kits . . . . .	13
Tab. 2.6	Verwendete Primer und PCR Parameter . . . . .	14
Tab. 2.7	Verwendete Primer und qPCR Parameter . . . . .	15
Tab. 2.8	Verwendete Nährmedien und deren Zusammensetzung . . . . .	15
Tab. 2.9	Verwendete Medienzusätze für die Zellkultur . . . . .	16
Tab. 2.10	Verwendete Puffer und Lösungen . . . . .	17
Tab. 2.11	Verwendete Software und Internetseiten . . . . .	18
Tab. 2.12	Verwendete Patientenproben . . . . .	19
Tab. 3.1	Verwendete Kulturmateriale und ausgesäte Zellzahlen nach Versuchen . . . . .	21
Tab. 3.2	Reaktionsmix für die RT . . . . .	24
Tab. 3.3	Reaktionsmix für die PCR . . . . .	25
Tab. 3.4	Bedingungen für die PCR . . . . .	25
Tab. 3.5	Biomers Reaktionsmix für die qPCR . . . . .	26
Tab. 3.6	Qiagen Reaktionsmix für die qPCR . . . . .	26
Tab. 3.7	Bedingungen für die qPCR . . . . .	27
Tab. 3.8	Liste der verwendeten Suchbegriffe für die Literaturrecherche . . . . .	30

## **D. Formelverzeichnis**

Formel 1	Berechnung der Populationsverdopplung aus Zellzahlen . . . . .	22
Formel 2	Berechnung der Effizienz aus der Steigung einer Standardkurve . . . . .	27
Formel 3	Berechnung des $\Delta\text{Ct}$ -Wertes eines Zielgens . . . . .	28
Formel 4	Berechnung des $\Delta\text{Ct}$ -Wertes eines Referenzgens . . . . .	28
Formel 5	Berechnung der Genexpression gemäß des relativen Quantifizierungsmodells . . .	28

## **E. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Orthopädischen Zentrum für Muskuloskelettale Forschung am Lehrstuhl für Orthopädie im König-Ludwig-Haus der Universität Würzburg erstellt. Dank an alle, die mich während dieser Zeit unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an den ärztlicher Direktor und Ordinarius für Orthopädie der Universität Würzburg Herrn Prof. Dr. Maximilian Rudert. Vielen Dank für die Überlassung des spannenden und praxisbezogenen Themas sowie die Betreuung als Doktorvater.

Insbesondere bei Frau Prof. Dr. Regina Ebert möchte ich mich für die geduldige und stets konstruktive Betreuung insbesondere im Rahmen der Laborarbeit und im Rahmen der Korrektur bedanken. Auch Herrn Prof. Dr. Franz Jakob als Leiter des Orthopädischen Zentrums für Muskuloskelettale Forschung danke ich für seine zusätzlichen Gedankenanstöße und Ratschläge.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Torsten Blunk für die Übernahme der fachinternen Zweitbegutachtung meiner Dissertation bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Norbert Schütze für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung des wissenschaftlichen Labors im König-Ludwig-Haus. Außerdem danke ich dem gesamten dortigen OP-Personal für die Unterstützung im Rahmen der Probengewinnung sowie dem Team der Pforte und des Fahrdienstes, die den Transport der Zellen organisiert haben.

Ein großes Dankeschön gilt dem gesamten Team des Osteologiezentrums: Melanie Krug, Jutta Meißner-Weigl, Dr. Birgit Mentrup, Dr. Sigrid Müller-Deubert, Doris Schneider und Sabine Zeck. Außerdem danke ich Beate Geyer und Jutta Schneiderei aus dem Labor im König-Ludwig-Haus.

Dank auch allen nicht explizit erwähnten Freunden und Leidensgenossen, die den langen Prozess der Promotion begleitet haben. Meinerseits findet das Gesprächsthema Dissertation hiermit einen Abschluss.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Dres. Eva Marie und Michael Braun, durch deren bedingungslose Unterstützung und Begleitung mein gesamter bisheriger Lebensweg und das Erreichte erst ermöglicht wurde! Auch meinen beiden Schwestern Charlotte und Hendrike möchte ich an dieser Stelle herzlich danken. Die Frage: „Braun, was macht die Doktorarbeit?“ möge ab diesem Zeitpunkt ruhen.

Meiner Frau Charlotte danke ich für Ihren Rückhalt und die Geduld, die Sie mir während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit und dem gesamten Studium entgegenbrachte.