

Aus der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus

Lehrstuhl für Orthopädie

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Maximilian Rudert

**In vitro-Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen aus dem menschlichen  
Hüftgelenk**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**vorgelegt von**

Mike Helmut Wagenbrenner

**aus** Bad Neustadt an der Saale

**Würzburg, Dezember 2020**



**Referent:** Prof. Dr. med. Boris Michael Holzapfel, Ph.D.

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. med. Fabian Gilbert

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2021

Der Promovend ist Arzt.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACT	autologe Chondrozyten Transplantation
AGG	Aggrecan
ALP	Alkalische Phosphatase
bidest.	bidestilliert
BM-MSCs	mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark
BMPs	Bone morphogenetic proteins
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c/EBP	CCAAT/Enhancer-binding-Proteine
ca.	circa
cAMP	cyclische Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
Col I	Collagen Typ I
Col II	Collagen Typ II
Col III	Collagen Typ III
Col X	Collagen Typ X
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
COX	Cyclooxygenase
d	Tag(e)
dest.	destilliert
DGOU	Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EEF1 $\alpha$	Elongation factor 1 $\alpha$
EFM	Einfriermedium
ESC	embryonale Stammzellen
et al.	et altera
EtOH	Ethanol

EZM	Extrazellulär-Matrix
FACS	Fluorescence-activated cell scanning
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HKB	hinteres Kreuzband
HSV	Herpes-Simplex-Viren
IBMX	3-Isobutylmethylxanthin
ICRS	International Cartilage Repair Society
IGF	Insulin-like growth factor
IHH	Indian Hedgehog
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
ISCT	International Society for Cellular Therapy
KMS	knochenmarkstimulierend
LCF	Ligamentum capitis femoris
MACI	Matrix-assoziierte autologe Chondrozyten- Implantation
MCL	mediales Kollateralband
MDB	Membrane desalting buffer
mg	Milligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSCs	mesenchymale Stromazellen
NaCl	Natriumchlorid
NSARs	nichtsteroidale Antirheumatika
o.g.	oben genannte
OC	Osteocalcin
OP	Osteopontin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung in Tween
PDGF	Plateled-derived growth factor

PPAR $\gamma$	Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptor
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Runx2	runt-related Transkriptionsfaktor 2
SCM	Stammzellmedium
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannte
Sox-9	sex-determining region Y-box 9
TAG	Triacylglyceride
TGF- $\beta$	Transforming growth Factor- $\beta$
U/mL	Einheiten pro Milliliter
VKB	vorderes Kreuzband
z.B.	zum Beispiel

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Knorpeldefekte und Möglichkeiten der Therapie	1
1.2	MSCs in der modernen Medizin	4
1.2.1	Wissenschaftliche Definition und Namensgebung der MSCs	4
1.2.2	Lokalisation und Differenzierungspotential von MSCs	5
1.2.3	MSCs in der Therapie von Knorpelschäden	6
1.3	Molekulare Signalwege der <i>in vitro</i> Differenzierung von MSCs	7
1.3.1	Wachstumsfaktoren für die Differenzierung von MSCs	7
1.3.1.1	Signalwege der adipogenen Differenzierung am Beispiel von Insulin, IBMX, Indomethacin und Dexamethason	7
1.3.1.2	Signalwege der osteogenen Differenzierung am Beispiel von $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbat und Dexamethason	8
1.3.1.3	Signalwege der chondrogenen Differenzierung am Beispiel der TGF- $\beta$ -Superfamilie	9
1.3.2	Gentherapeutische Ansätze in der chondrogenen Differenzierung von MSCs	10
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
2.1	Material	12
2.1.1	Einwegmaterialien	12
2.1.2	Chemikalien	13
2.1.3	Zellkulturmedien und Zusätze zur Zellkultur	16
2.1.4	Immunhistochemische Antikörper	18
2.1.5	Antikörper für die Durchflusszytometrie	18
2.1.6	Enzyme	19
2.1.7	Primer der semiquantitativen RT-PCR	19
2.1.8	Lösungsmittel und Reagenzpuffer	21
2.1.9	Bausätze und Kits	23
2.1.10	Laborgeräte	24
2.1.11	Software	26
2.2	Methoden	27

2.2.1	Isolation und Kultivierung der Zellen	27
2.2.1.1	Isolation der Zellen aus den Nativgeweben	27
2.2.1.2	Ablösung und Kryokonservierung der Zellen	29
2.2.1.3	Auftauen der kryokonservierten Zellen	30
2.2.2	Analyse der Oberflächenantigene	30
2.2.3	Multipotente Differenzierung der Zellen	31
2.2.3.1	Monolayer-Zellkulturen für die adipogene und osteogene Differenzierung	31
2.2.3.1.1	Osteogene Differenzierung	32
2.2.3.1.2	Adipogene Differenzierung	32
2.2.3.2	Pellet-Zellkulturen für die chondrogene Differenzierung	33
2.2.3.2.1	Chondrogene Differenzierung	33
<b>2.3</b>	<b>Histologische Untersuchungen</b>	<b>34</b>
2.3.1	Fixieren und Einbetten der nativen Gewebeproben in Paraffin	34
2.3.2	Schneiden und Entparaffinieren der nativen Gewebeproben	35
2.3.3	HE-Färbung	35
2.3.4	Oil Red O-Färbung	36
2.3.5	Alizarinrot S-Färbung	37
2.3.6	Kryokonservierung der Pellet-Zellkulturen	38
2.3.7	Kryoschnitte der MPC-Pellets	38
2.3.8	Alcianblau-Färbung	39
2.3.9	Immunhistochemische Untersuchungen	39
2.3.9.1	Immunhistochemische Collagen Typ I-Färbung	41
2.3.9.2	Immunhistochemische Collagen Typ II-Färbung	41
2.3.9.3	Immunhistochemische Collagen Typ X-Färbung	41
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungen</b>	<b>42</b>
2.4.1	Isolation des Zell-Lysats	42
2.4.1.1	Lysieren der Monolayer-Zellkulturen	42
2.4.1.2	Lysieren der Pellet-Zellkulturen	42
2.4.2	RNA-Aufreinigung	43
2.4.3	cDNA-Synthese	44
2.4.4	Semiquantitative RT-PCR	44
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	45
2.4.6	Statistische Auswertung	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
3.1	Isolation und Kultivierung der Zellen aus den Nativgeweben des Hüftgelenks	47

3.1.1	HE-Färbung der Nativgewebe	47
3.1.2	Wachstum und Morphologie der Zellen	49
<b>3.2</b>	<b>FACS-Analyse der Oberflächenantigene</b>	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Adipogene Differenzierung</b>	<b>52</b>
3.3.1	Mikroskopische Unterschiede im Rahmen der adipogenen Differenzierung	52
3.3.2	Oil Red O-Färbung der Monolayer-Zellkulturen	53
3.3.3	Semiquantitative RT-PCR adipogener Markergene	55
<b>3.4</b>	<b>Osteogene Differenzierung</b>	<b>57</b>
3.4.1	Ausbildung mikroskopischer Unterschiede im Rahmen der osteogenen Differenzierung	57
3.4.2	Alizarinrot S-Färbung der Monolayer-Zellkulturen	59
3.4.3	Immunhistochemische Färbung des Markermoleküls Collagen Typ I	61
3.4.4	Semiquantitative RT-PCR osteogener Markergene	63
<b>3.5</b>	<b>Chondrogene Differenzierung</b>	<b>65</b>
3.5.1	Alcianblau-Färbung der Pellet-Zellkulturen	65
3.5.2	Immunhistochemische Färbung des Markermoleküls Collagen Typ II	67
3.5.3	Immunhistochemische Färbung des hypertrophen Markermoleküls Collagen Typ X	69
3.5.4	Semiquantitative RT-PCR chondrogener Markergene	71
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>74</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der verwendeten Materialien und Methoden</b>	<b>74</b>
4.1.1	TGF- $\beta$ 1 im Vergleich mit anderen chondrogenen Wachstumsfaktoren	74
4.1.2	Pellet-Kulturen im Vergleich zu anderen dreidimensionalen Kulturverfahren	75
4.1.3	Zellkulturen mithilfe von Wachstumsfaktoren versus Gentherapie	76
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse der einzelnen Differenzierungswege und Expression von Oberflächenantigenen</b>	<b>77</b>
4.2.1	Adipogene Differenzierung der MSCs	77
4.2.2	Osteogene Differenzierung der MSCs	78
4.2.3	Chondrogene Differenzierung der MSCs	78
4.2.4	Hypertrophe Differenzierung der MSCs während der Chondrogenese	79
4.2.5	Expression charakteristischer MSC-Oberflächenmarker	80
<b>4.3</b>	<b>Vergleich mit anderen in vitro Studien zur Isolation von MSCs aus unterschiedlichen Nativgeweben</b>	<b>81</b>

<b>4.4</b>	<b>Vergleich mit anderen in vitro Studien zur adipogenen und osteogenen Differenzierung von MSCs aus unterschiedlichen Nativgeweben</b>	<b>82</b>
<b>4.5</b>	<b>Vergleich mit anderen in vitro Studien zur chondrogenen Differenzierung von MSCs aus unterschiedlichen Nativgeweben</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>89</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

**TABELLENVERZEICHNIS**

**DANKSAGUNG**

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Knorpeldefekte und Möglichkeiten der Therapie

In diarthrodialen Gelenken, wie dem Hüft- oder Kniegelenk, bildet der hyaline Gelenkknorpel durch seine Gleitfähigkeit und Belastbarkeit gegenüber Scher- und Achskräften eine zentrale Komponente [1-3]. Trotz der hohen Belastbarkeit dieser lasttragenden Einheit des Gelenks sind durch lebenslang einwirkenden, bio-mechanischen Stress multiple Schädigungen möglich. Die Ätiologie der Knorpelschäden erstreckt sich von akut, traumatisch auftretenden Verletzungen des Gelenkknorpels bis hin zu degenerativen Schädigungen, wie der meist im fortgeschrittenen Alter einsetzenden Osteoarthritis, die zu den häufigsten chronischen Erkrankungen in Deutschland zählt [4]. Im Kontrast zu der großen Bandbreite an Verletzungen des Gelenkknorpels steht die stark eingeschränkte Fähigkeit des hyalinen Knorpels zur Regeneration. Aufgrund der fehlenden Vaskularisierung und neuralen Versorgung, der folglich eingeschränkten Möglichkeit zur Migration von externen Chondroprogenitorzellen, sowie der limitierten Proliferationsfähigkeit von Chondrozyten gilt der Gelenkknorpel als ein bradytrophes Gewebe mit geringer Stoffwechselaktivität [1, 3, 5]. Durch die Gefäßlosigkeit des hyalinen Gelenkknorpels kann ein Defekt, der nicht bis an den vaskularisierten subchondralen Knochen reicht, lediglich durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt werden. Dies macht eine vollständige Regeneration des Knorpeldefekts mit *restitutio ad integrum* ohne Anschluss an das subchondrale Knochengewebe nicht möglich [1, 5].

Um eine Reparatur des Defekts zu ermöglichen sind zum einen Chondroprogenitorzellen und zum anderen ein Anschluss an das Gefäßsystem nötig, um über diesen wichtige chemotaktische und mitogene Faktoren, sowie pro-chondrogene Wachstumsfaktoren bereitzustellen [1]. Reicht der Defekt des hyalinen Knorpels bis an den subchondralen, gefäßreichen Knochen können über ein sich bildendes Hämatom und lokal ausgeschüttete Wachstumsfaktoren wie den Platelet-derived growth factor (PDGF), den Insulin-like growth factor (IGF) oder die Transforming growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Superfamilie vermittelt, mesenchymale Stromazellen (MSCs) aus dem Knochenmark einwandern [1, 2, 6-9]. Idealerweise erfolgt eine Differenzierung dieser Vorläuferzellen zu Chondrozyten, jedoch weist die neu gebildete Extrazellulär-Matrix (EZM) im Bereich der Knorpeldefekte *in vivo* häufig einen hohen Anteil des für Faserknorpel typischen Collagen Typ I (Col I) auf [1, 2]. Weitere Schwierigkeiten stellen die ungenügende Integration des neugebildeten Knorpels in das umliegende Gewebe, sowie eine durch die Zusammensetzung und Organisation der neu gebildeten EZM bedingte, geringere biomechanische Belastbarkeit des Ersatzgewebes dar, die zu einer schnelleren Degeneration des Gelenkknorpels mit einer vorzeitigen Entstehung einer Arthritis führen kann [9-11].

Das klassische, durch arthroskopische Diagnostik ermittelte, Klassifikationssystem für degenerative Knorpelschäden entstammt der Stadieneinteilung der Chondromalazie nach Outerbridge von 1961 [12]. Basierend auf dieser und nachfolgenden Klassifikationen entwickelte die International Cartilage Repair Society (ICRS) 1997 den 5-stufigen ICRS-Score, mit dessen Hilfe Lokalisation, Morphologie und Ausdehnung osteochondraler Läsionen beschrieben werden können [13].

ICRS Grad		Status des Gelenkknorpels	Defekteinteilung nach ICRS
0		normal	keine erkennbaren Defekte
I	a	fast normal	oberflächliche Erweichung
	b		und/oder oberflächliche Fissuren
II		abnormal	< 50% der Knorpeldicke
III	a	ausgeprägt abnormal	> 50% der Knorpeldicke, aber nicht die kalzifizierende Schicht erreichend
	b		> 50%, bis in die kalzifizierende Schicht reichend
	c		> 50%, bis auf (aber nicht in) den subchondralen Knochen reichend
	d		> 50%, mit Blasenbildung
IV	a	ausgeprägt abnormal (osteochondrale Läsionen)	bis eben nach subchondral reichend
	b		subchondral bis tief in den trabekulären Knochen reichend

**Tabelle 1: Tabelle zur Einstufung des ICRS-Score bei isolierten chondralen oder osteochondralen Läsionen des Gelenkknorpels (nach Brittberg, Evaluation of cartilage injuries and repair)**

Nach dem Therapiealgorithmus der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGO) aus dem Jahr 2016 [14] sollten symptomatische, kleine Defekte ab Grad ICRS III, die nicht bis subchondral reichen, bei weniger aktiven Patienten mithilfe knochenmarkstimulierender (KMS) Operationsverfahren wie der Mikrofrakturierung therapiert werden. Dadurch soll der Kontakt zum subchondralen Knochengewebe und dessen Blutgefäßsystem, sowie den darin enthaltenen Vorläuferzellen und Wachstumsfaktoren, etabliert werden [15, 16]. Trotz der häufig erzielten Besserung der klinischen Symptome und der Funktionalität enthält das dadurch stimulierte Regeneratgewebe im Vergleich zum hyalinen Knorpel oft einen hohen Anteil Col I, sowie einen niedrigeren Anteil des knorpelspezifischen Collagen Typ II (Col II) und ist lediglich bei lokalisierten Knorpeldefekten einsetzbar [1, 2, 10].

Fokale Knorpeldefekte junger Patienten mit hohen funktionellen Ansprüchen an das betroffene Gelenk, sowie größere Defekte des Gelenkknorpels, die bis an den subchondralen Knochen reichen, werden daher häufig mithilfe der autologen Chondrozyten Transplantation (ACT) therapiert [17-23]. Subjektiv führt auch diese Behandlungsmethode häufig zu einer Linderung der Symptome des Patienten und erzeugt einen Regeneratknorpel, der im Vergleich zur Mikrofrakturierung reicher an Col II ist. In den meisten Fällen liefert die ACT jedoch ebenfalls keinen langfristig belastungsstabilen Gelenkknorpel [1, 2, 23, 24]. Weitere Probleme der ACT sind die zweizeitige Operationstechnik, die geringe Zahl isolierbarer autologer Chondrozyten oder mangelhafte Differenzierung und Integration der transplantierten Zellen *in vivo* [23-26]. Durch die Matrix-assoziierte autologe Chondrozyten-Implantation (MACI) konnte durch die Verwendung von Biomaterialien, in die die Chondrozyten vor der Implantation eingebettet wurden, die Einheilung der Zellen verbessert und ein histologisch hyalinartiges Knorpelregenerat erzeugt werden [27, 28]. Seneszenz, Apoptose und Nekrose der transplantierten Zellen *in situ* stellen jedoch bis heute eine Limitierung der ACT dar [21, 25, 29]. Eine Alternative für die Therapie bis subchondral reichender Defekte mit kleinerem Durchmesser liefert die Transplantation eines osteochondralen Autografts [2, 14]. Obwohl dieses Verfahren eine gute Alternative zur Therapie umschriebener, osteochondraler Läsionen darstellt, stellen fehlende Stabilität und Integration des Transplantats, sowie die Schaffung eines iatrogenen Knorpeldefekts Schwierigkeiten dar [30-32]. Die Suche nach einem hyalinen, langzeitstabilen Knorpelregenerat hält also bis heute an.

Das Tissue Engineering (TE) stellt einen mehrdimensionalen Therapieansatz zur Behandlung größerer Schäden des Gelenkknorpels dar [25, 33]. Hierbei erfolgt die Therapie des Knorpeldefekts mittels der sogenannten (sog.) Triade des TE aus autologen Zellen, deren chondrogene Differenzierung nach Transplantation durch den Einsatz geeigneter Biomaterialien, sowie Wachstumsfaktoren und die Aktivierung chondrogener Signalwege optimiert wird [6, 34-36]. Eine Vielzahl von Studien zeigte bereits das MSCs *in vitro* durch die Zugabe oder den genetischen Transfer von Wachstumsfaktoren wie die der TGF- $\beta$ -Superfamilie oder IGF-1 chondrogen differenziert werden können [37-39]. Durch die Simulation der EZM des hyalinen Knorpels anhand natürlicher oder synthetischer Biomaterialien können die Adhärenz der MSCs *in situ* sowie ihre chondrogene Differenzierungsfähigkeit zusätzlich verbessert werden [40-43]. Moderne biomimetische und nanofibröse Trägermaterialien (sog. Scaffolds) ermöglichen dabei die Nachstellung des zonenhaften Aufbaus des Gelenkknorpels [44, 45]. Zusätzlich können beispielsweise (bspw.) chondrogene Wachstumsfaktoren in Hydrogele integriert werden, die dort auch nach der Implantation *in vivo* einen pro-chondrogenen Differenzierungsreiz auf die MSCs ausüben können [46].

Die am längsten bekannte und am häufigsten verwendete Subpopulation von MSCs ist die der aus dem Knochenmark isolierten MSCs (BM-MSCs). Heute können multipotent differenzierungsfähige MSC-ähnliche Zellen, die im Vergleich zu BM-MSCs eine ähnliche chondrogene Differenzierungsfähigkeit aufweisen, jedoch auch mit geringerer operativer Zugangsmorbidität aus leicht zugänglichen Geweben isoliert werden [47-50].

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Präsenz und Charakteristika von MSC-ähnlichen Zellen aus dem Ligamentum capitis femoris (LCF), sowie der anterioren Hüftgelenkscapsel aus den arthrotischen Hüftgelenken von fünf Frauen zu untersuchen. Die Charakteristika dieser Zellen sollten mit denen von BM-MSCs und MSC-like Zellen aus arthrotischem Knorpel verglichen werden, die aus denselben arthrotischen Hüftgelenken der fünf Patienten isoliert wurden. So sollten weitere innovative Quellen zur Isolation von MSCs aufgezeigt werden und ein weiterer Beitrag zur Optimierung der Kombination verschiedener Zellen, Wachstumsfaktoren und Biomaterialien im Bereich des TE für Knorpeldefekte geleistet werden.

## **1.2 MSCs in der modernen Medizin**

### **1.2.1 Wissenschaftliche Definition und Namensgebung der MSCs**

MSCs sind multipotent differenzierungsfähige Vorläuferzellen, die 1966 zum ersten Mal von Friedenstein et al. aus dem Knochenmark gewonnen wurden [51, 52]. Neben den BM-MSs, können MSC-ähnliche Zellen auch aus einer Vielzahl anderer adulter oder neonataler Gewebe gewonnen werden [49, 53-56].

MSCs entstammen dem somatischen Blatt des Seitenplattenmesoderm (SPM). Zellen des SPM bilden später Bestandteile von Knochen-, Nerven-, Fett-, Muskel-, Sehnen- und Knorpelgewebe, wie auch Blutgefäße und tragen ebenso zu ihrer Regeneration bei [51, 57-61]. Voraussetzung für diese Differenzierungsvorgänge sind Zell-Zell-, Zell-Matrix- und EZM-Interaktionen, sowie Signale von lokal ausgeschütteten Wachstumsfaktoren *in vivo* oder unter Kulturbedingungen *in vitro* [25, 47, 61-63]. Für die Chondrogenese ist bspw. die Adaption an ein hypoxisches Milieu, die Aktivierung des sex-determining region Y-box 9 (Sox-9)-Signalwegs und die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 und IGF-1 von elementarer Bedeutung [47, 64-66].

2006 wurden von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) eine Anzahl von Minimalkriterien zur Definition von MSCs festgelegt, die diese definieren und somit ihren Vergleich in wissenschaftlichen Arbeiten vereinheitlichen und vereinfachen sollten [67, 68]. Demnach müssen MSCs adhärent in Plastik-Gewebekulturflaschen wachsen [69]. Weiterhin

müssen  $\geq 95\%$  der isolierten MSCs in der Durchflusszytometrie positiv für die Oberflächenantigene Cluster of Differentiation (CD)73, CD90 und CD105 sein und lediglich  $\leq 2\%$  der MSC dürfen positiv für hämatopoetische Oberflächenmarker wie CD45, CD34 oder CD14 sein [67, 68]. Das letzte der drei Hauptkriterien gibt vor, dass die Zellen multipotent - adipogen, osteogen und chondrogen - differenzierbar sein müssen [67, 68].

Hinsichtlich der Namensgebung von MSCs herrscht in den letzten Jahren eine zunehmende Kontroverse [70]. Ursprünglich galt der Terminus MSCs als Abkürzung für mesenchymale Stammzellen. Da MSCs *in vivo* jedoch nicht die Funktion einer Stammzelle aufweisen, sondern lediglich zur Regeneration eines vorbestimmten Gewebes dienen, erschien diese Namensgebung unpassend. Die Beschreibung als mesenchymale Stromazellen entsprang der Vermutung, dass diese Vorläuferzellen in der stromalen Sektion von Geweben mesodermalen Ursprungs gefunden werden können [70]. Neuere Arbeiten zeigten jedoch, dass MSCs möglicherweise aus Perizyten hervorgehen, die wiederum in der perivaskulären Region innerhalb vieler menschlicher Gewebe gefunden werden können [71].

### 1.2.2 Lokalisation und Differenzierungspotential von MSCs

Friedenstein et al. beschrieben 1966 als Erste die Kultivierung spindelförmiger, Fibroblasten-ähnlicher MSCs, aus dem Knochenmark [52, 53]. Heute sind BM-MSCs einfach enzymatisch zu isolieren [72, 73] und *in vitro* zu kultivieren und zu differenzieren [25, 51, 74]. Im Gegensatz zu pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESCs) werfen MSCs weniger ethische Fragestellungen auf und wirken anders als induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) nicht tumorigen [75-77].

Beim Erwachsenen konnten MSCs bereits aus Fettgewebe [54], peripherem Blut [78], der Lunge [79], dem Herzen [80], dem Nierenkortex und der Nierenkapsel [81], sowie der Leber [82] isoliert werden. Neonatale Gewebe wie die Wharton-Sulze der Nabelschnur, die Eihäute des Chorions und Amnions oder die Plazenta enthalten ebenfalls multipotent differenzierungsfähige MSCs [55, 83-85]. MSCs aus perinatalen Geweben wie der Nabelschnur sind gegenüber den adulten BM-MSCs ohne invasive Maßnahmen in großen Mengen isolierbar und wirken dabei trotzdem weniger immunogen als BM-MSCs [75, 86-88]. 2002 beschrieben Zuk et al. zum ersten Mal das menschliche Fettgewebe als Quelle multipotenter MSC-ähnlicher Zellen [89]. Anders als BM-MSCs ließen diese sich anhand minimalinvasiver Maßnahmen in großer Zahl isolieren und einfach kultivieren [49, 54, 89, 90] und waren trotzdem adipogen [91], osteogen [92] und chondrogen [93, 94] differenzierbar. Obwohl verschiedene Studien uneins sind, ob MSC-ähnlicher Zellen aus dem Fettgewebe ein mit BM-MSCs vergleichbares chondrogenes Differenzierungspotential besitzen, liefern sie

eine weitere, vielversprechende Quelle multipotenter Vorläuferzellen zur Therapie von Knorpelschäden [95, 96]. Immer mehr Arbeiten widmen sich außerdem mit Erfolg der Isolierung und Differenzierung von MSC-ähnlicher Zellen aus ligamentären Geweben [97, 98], sowie aus der synovialen Membran und Flüssigkeit diarthrodialer Gelenke [99, 100]. Beachtlicherweise scheinen MSC-like Zellen aus synovialen Geweben ein chondrogenes Differenzierungspotential zu besitzen, das dem von BM-MSCs überlegen ist [50]. In einzelnen Therapieversuchen *in vivo* zeigte sich nach der Transplantation von MSC-like Zellen aus synovialem Gewebe in Knorpeldefekte des menschlichen Kniegelenkes eine Regeneration des fokalen Knorpeldefekts [101, 102]. Weiterhin ist bekannt, dass sowohl gesunder als auch arthrotischer, hyaliner Gelenkknorpel MSC-like Zellen enthält [103, 104]. Diese Zellen können günstigerweise direkt im Bereich eines Knorpeldefekts entnommen werden und scheinen bereits auf die Erzeugung hyalinen Knorpels vorprogrammiert zu sein [105]. Interessanterweise finden sich all diese unterschiedlichen Gewebe auch im Knochenmark, dem Gelenkknorpel, dem LCF, sowie der Gelenkkapsel des arthrotisch veränderten Hüftgelenks und werden im Zuge der Implantation einer Hüft-Totalendoprothese (TEP) über den anterioren Zugang routinemäßig entfernt. In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass sich all diese Gewebe auch zur Isolation von MSC-like Zellen eignen.

### 1.2.3 MSCs in der Therapie von Knorpelschäden

Bereits 1998 gelang Johnstone et al. mithilfe des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 *in vitro* die chondrogene Differenzierung von BM-MSCs aus Kaninchen [106]. Seither entwickelte sich die Chondrogenese der multipotenten Zellen durch die Identifikation neuer Zell-Quellen, sowie entscheidender chondrogener Wachstumsfaktoren und Signalwege, zu einem vielversprechenden Ansatz in der Therapie von Knorpelschäden [37, 49, 107]. MSCs scheinen zur Therapie von Knorpeldefekten *in vivo* ein Milieu zu benötigen, welches die Chondrogenese fördert und gleichzeitig einen dauerhaft chondrogenen Phänotyp der differenzierten MSCs erhält [25, 37, 108].

Der genau regulierte Ablauf der Knorpelerzeugung *in vitro* kann am besten durch einen Blick auf die verschiedenen Stadien der enchondralen Ossifikation und der daran beteiligten Wachstumsfaktoren wie der TGF- $\beta$ -Superfamilie, dem parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) und Indian Hedgehog (IHH) verstanden werden [38, 63]. Insbesondere der Ablauf phänotypischer, molekulargenetischer und histologischer Veränderungen kann *in vitro* durch die Verwendung von Pellet-Zellkulturen dargestellt werden [109].

Der Bereich des TE, sowie die damit verbundene Erzeugung eines langfristig stabilen, hyalinen Knorpels *in vivo* ist jedoch mit vielen Hürden verbunden, die Gegenstand aktueller Forschung sind: Die Identifikation spezifischer Wachstumsfaktoren und Signalwege, die

Suche nach einem optimalen Verfahren um MSCs an den Ort des Defekts zu transportieren, vor Ort zu erhalten und chondrogen zu differenzieren, sowie zelluläre Seneszenz oder hypertrophe De-Differenzierung [25, 109, 110]. Arbeiten zur *in vitro* Chondrogenese von MSCs durch Wachstumsfaktoren aus der Gruppe der TGF- $\beta$ -Superfamilie, wie bspw. Bone morphogenetic proteins (BMPs) oder TGF- $\beta$ 1, führten zu zunehmender Hypertrophie in MSCs, die mit einer unerwünschten Kalzifizierung und Neo-Angiogenese *in vivo* einhergeht [25, 111-114]. Durch häufig verwendete Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie werden also nicht nur die erwünschte chondrogene Differenzierung, sondern auch unerwünschte Ereignisse wie die osteogene De-Differenzierung und das finale Stadium der chondrogenen Hypertrophie gefördert [112-115]. Im Zuge der enchondralen Ossifikation innerhalb der Wachstumsfuge ist dieser Vorgang zwar physiologisch erwünscht, der Einsatz von MSCs zur Therapie von Knorpelschäden wird dadurch jedoch erschwert und begrenzt [25]. Das Verständnis und die Beziehung von unterschiedlichen Signalwegen der Proliferation, Differenzierung und Hypertrophie von Chondrozyten in der Wachstumsfuge, wie Sox-9, IHH oder PTHrP, ist daher elementar, um den therapeutischen Einsatz von MSCs zu optimieren [116-118]. So kann schließlich die richtige Kombination an Faktoren und Signalwegen zur chondrogenen Differenzierung unterschiedlicher Subpopulationen von MSCs ermittelt werden.

### **1.3 Molekulare Signalwege der *in vitro* Differenzierung von MSCs**

#### **1.3.1 Wachstumsfaktoren für die Differenzierung von MSCs**

##### **1.3.1.1 Signalwege der adipogenen Differenzierung am Beispiel von Insulin, IBMX, Indomethacin und Dexamethason**

Die von der ISCT definierten Minimalkriterien für die Charakterisierung von MSCs umfassen wie bereits erwähnt die Fähigkeit zur adipogenen Differenzierung [67, 68]. Eine gängige Methode zur Erbringung dieses Nachweises *in vitro* ist die auch in dieser Arbeit angewandte Inkubation von Zellen mit einem spezifischen, mit Wachstumsfaktoren ergänztem Zellmedium [119]. Die verwendeten Mediumzusätze Insulin, 3-Isobutylmethylxanthin (IBMX), Indomethacin und Dexamethason bilden dabei standardmäßig die Grundlage vieler möglicher Kombinationen von Wachstumsfaktoren zur Induktion der Adipogenese in MSCs [51, 119, 120].

Das Peptidhormon Insulin gilt als der entscheidende Induktor der adipogenen Differenzierung [121, 122]. Insulin wirkt mitogen auf adipozytäre Vorläuferzellen und steigert sowohl die Expression adipogener Markergene als auch die Aufnahme von Glucose, die zur späteren Bildung intrazellulärer Lipidtröpfchen dient [123-127]. Das Glucocorticoid Dexamethason hat neben seinen anti-apoptischen [128] und proliferativen [129] Eigenschaften einen

fördernden Einfluss auf die adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung konfluent wachsender MSCs [74, 122, 130, 131]. Der Wachstumsfaktor IBMX führt durch eine Blockade von Phosphodiesterasen zu einer höheren intrazellulären Konzentration von cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und dadurch zu einer Hochregulation adipogener Transkriptionsfaktoren [122]. Ebenso steigern IBMX und Dexamethason ähnlich wie Insulin die Expression verschiedener CCAAT/Enhancer-binding-Proteine (c/EBP), die mit dem Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) zu den wichtigsten Regulatorgenen der Adipogenese zählen [127, 132-134]. Dem Cyclooxygenase (COX) Inhibitor Indomethacin wird zwar eine im Vergleich zu den anderen beschriebenen Faktoren untergeordnete Rolle im Rahmen der Adipogenese von MSCs *in vitro* zugeschrieben, jedoch identifizierten Wu et al. nichtsteroidale Antirheumatika (NSARs) als Aktivatoren des PPAR $\gamma$ -Signalwegs [135]. Wie vorher beschrieben gelten c/EBP aber vor allem PPAR $\gamma$  als die wichtigsten Transkriptionsfaktoren der Adipogenese, was durch die Unfähigkeit zur adipogenen Differenzierung von Zellen in Abwesenheit von PPAR $\gamma$  erfolgreich bewiesen werden konnte [133, 134, 136, 137]. Die Steigerung ihrer Bildung in MSCs durch die Inkubation mit den beschriebenen Wachstumsfaktoren *in vitro* mündet somit letztendlich in einer gesteigerten Expression an der adipogenen Differenzierung beteiligter Gene [133].

#### 1.3.1.2 Signalwege der osteogenen Differenzierung am Beispiel von $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbat und Dexamethason

Die Kombination der drei Wachstumsfaktoren  $\beta$ -Glycerophosphat, L-Ascorbat und Dexamethason, vereinfacht zusammengefasst als DAG, ist eine häufig verwendete Kombination zur Induktion der osteogenen Differenzierung von MSCs *in vitro* [131]. Die Voraussetzung dafür ist eine Inkubation von Monolayer-Zellkulturen in diesem auf der DAG-Kombination basierenden Differenzierungsmedium für eine Zeitspanne von etwa drei Wochen [138].

$\beta$ -Glycerophosphat dient dabei zum einen als Phosphatgruppenlieferant zur Produktion des Matrixminerals Hydroxylapatit [131], zum anderen bewirken diese durch  $\beta$ -Glycerophosphat bereitgestellten, anorganischen Phosphatgruppen auch eine zellinterne Hochregulation osteogener Markergene *in vitro* [139, 140]. Zu hohe Konzentrationen an  $\beta$ -Glycerophosphat können jedoch durch dystrophe Matrixmineralisationen zu falsch positiven histologischen Färbungen in osteogen differenzierten MSCs führen. Daher sind zusätzliche molekularbiologische und immunhistochemische Auswertungen zum Beweis der erfolgreichen osteogenen Differenzierung der MSCs von Vorteil [131].

Wie bereits erwähnt begünstigt Dexamethason neben der adipogenen und chondrogenen auch die osteogene Differenzierung von MSCs [122, 129, 131]. Trotz der unklaren und

vielfältigen Wirkmechanismen von Dexamethason auf MSCs zeigten Hamidouche et al. 2008 erstmals, dass Dexamethason über eine Aktivierung des WNT/ $\beta$ -Catenin Signalwegs und der damit verbundenen Expression des runt-related Transkriptionsfaktor 2 (Runx2) auch speziell die osteogene Differenzierung induzieren kann [141, 142]. Die Rolle von L-Ascorbat für die osteogene Differenzierung von MSCs *in vitro* schien sich lange auf die Hydroxilierung von Aminosäuren in Vorläufermolekülen von Col I, sowie der damit verbundenen Ausbildung einer Helix-Struktur zu beschränken [143, 144]. Die Bildung dieser für Knorpelgewebe typischen, Col I-haltigen EZM induziert zwar die osteogene Differenzierung von MSCs, jedoch bewirkt L-Ascorbat zusätzlich eine Steigerung des bereits genannten Transkriptionsfaktors Runx2 [131]. Dieser, durch Dexamethason und L-Ascorbat, vermehrt exprimierte Transkriptionsfaktor Runx2 gilt als einer der bedeutendsten Transkriptionsfaktoren der frühen Osteogenese [145] und mündet final in der Bildung wichtiger osteogener EZM-Bestandteile sowie einer Expression spezifischer osteogener Markergene [146, 147].

#### 1.3.1.3 Signalwege der chondrogenen Differenzierung am Beispiel der TGF- $\beta$ -Superfamilie

Das Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren ist für die Entwicklung und den Stoffwechsel des bradytrophen hyalinen Knorpelgewebes sowie der Produktion von spezifischen EZM-Proteinen wie Proteoglykanen oder Col II essentiell [37, 118]. Diese Fähigkeit bestimmter Wachstumsfaktoren zur Induktion der Chondrogenese wird auch bei der chondrogenen Differenzierung von MSCs *in vitro* genutzt. Die TGF- $\beta$ -Superfamilie zählt zu dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren und umfasst neben den gleichnamigen Molekülen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 auch die Gruppe der BMPs [37, 148]. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe gehören die Moleküle TGF- $\beta$ 1, BMP-2 und BMP-7 [37]. Interessanterweise sind die verschiedenen Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie neben der enchondralen Ossifikation auch entscheidend an der Chondrogenese mesenchymaler Vorläuferzellen beteiligt [118]. TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 fördern die Proliferation und Differenzierung von MSCs als auch die Produktion von knorpelspezifischen Matrixproteinen wie Proteoglykanen und Col II *in vitro* [37, 149]. Des Weiteren ist TGF- $\beta$ 1 aber auch an der terminalen chondrogenen Differenzierung von MSCs *in vitro* und dem damit verbundenen Übergang in ein hypertrophes, osteogenes Wachstum beteiligt [150]. BMP-7 hemmt zwar die Proliferation von MSCs, steigert aber ähnlich wie TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 die Produktion von chondrogenen Matrixproteinen [37]. Bekannte Probleme bei der Anwendung von TGF- $\beta$ 1 *in vivo* sind Fibrosen, osteophytäre Anbauten und Entzündungen im Bereich des therapierten Gelenkknorpels, die im Gegensatz dazu bei der Verwendung von BMP-7 nicht beobachtet werden konnten [37]. Ihre Wirkung entfalten viele dieser Wachstumsfaktoren über

intrazelluläre Signalwege, die zur Aktivierung und Stabilisierung einiger essentieller Transkriptionsfaktoren der hyalinen Knorpelbildung, wie bspw. Sox-9, beitragen [151-153].

Der Transkriptionsfaktor Sox-9 kontrolliert vor allem die frühe chondrogene Entwicklung von MSCs und spielt eine wichtige Rolle bei der direkten Regulation der Expression chondrogener Markergene wie Collagen Typ II (Col II) und Aggrecan (AGG) [66, 154]. Von großer Wichtigkeit ist aber auch die durch Sox-9 vermittelte Suppression der chondrogenen Hypertrophie durch eine Minderung der Expression der beteiligten Gene wie Collagen Typ X (Col X) oder des osteogenen Transkriptionsfaktors wie Runx2 [151, 155].

Neben der TGF- $\beta$ -Superfamilie existieren eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren zur chondrogenen Differenzierung von MSCs [37]. IGF-1 besitzt eine proliferationsfördernde Wirkung auf MSCs, führt zu einer vermehrten Bildung chondrogener Markerproteine und verbessert in Kombination mit TGF- $\beta$ 1 die Ergebnisse chondrogener Differenzierung *in vitro* [37, 156]. Ähnlich wie bei TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 lässt die chondrogene Wirkung von IGF-1 im Alter oder in arthrotischen Gelenken nach. Unter Zusatz von BMP-7 konnten MSCs aber auch unter diesen Bedingungen bereits erfolgreich chondrogen differenziert werden [37, 157]. IHH hingegen gehört zur Familie der Hedgehog-Proteine, die über PTHrP-abhängige und unabhängige Signalwege die embryonale Chondrogenese im Bereich der Wachstumsfuge beeinflussen [117, 158]. Gemeinsam entschleunigen die miteinander in Verbindung stehenden Signalwege von IHH und PTHrP die Reifung und den damit verbundenen Eintritt in ein hypertrophes Endstadium von MSCs während der Chondrogenese [116, 158, 159].

Das Verständnis des komplexen Zusammenspiels verschiedener Wachstumsfaktoren, die zum einen die frühe Chondrogenese der MSCs beeinflussen, sowie einen Übergang in ein spätes hypertrophes Wachstumsstadium verhindern sollen, ist während der chondrogenen Differenzierung also von großer Bedeutung.

### 1.3.2 Getherapeutische Ansätze in der chondrogenen Differenzierung von MSCs

Obwohl die chondrogene Differenzierung von MSCs mithilfe löslicher Wachstumsfaktoren *in vitro* vielversprechende Ergebnisse liefert, erschweren die kurze Halbwertszeit, sowie die aufwendige, wiederholte Applikation solcher Wachstumsfaktoren am Ort des Defekts die Aufrechterhaltung einer wirksamen Konzentration *in vivo* [26, 160]. Eine mögliche Lösung bietet der nicht-virale und virale Transfer bestimmter Zielgene in MSCs. Dies ermöglicht nicht nur die unabhängige Produktion von pro-chondrogenen Wachstumsfaktoren im direkten Umfeld des Defekts, sondern ermöglicht die gezielte Aktivierung gewünschter Signalwege innerhalb der MSCs [25, 26, 161]. Zu den möglichen Zielgenen der chondrogenen Differenzierung gehören die bereits aufgezählten chondrogenen Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1, BMPs oder IGF-1, sowie Modulatoren des hypertrophen Wachstums wie Sox-9 und

IHH [26]. Neben der Unterscheidung zwischen non-viralem oder viralem Gentransfer können MSCs dabei vor der Anwendung im gewünschten Gelenk *ex vivo* oder direkt intraartikulär *in vivo* mithilfe des Gentransfers modifiziert werden [26, 160].

Non-virale Vektoren wie Liposomen sind einfach herzustellen und im Gegensatz zu viralen Vektoren meist nicht potentiell infektiös. Gleichzeitig sind sie in ihrer Übertragungsart jedoch weniger effektiv, können entzündlich wirken und die übermittelte transgene Expression ist nur von kurzer Dauer [26, 160, 162].

Zu der Gruppe der etablierten viralen Vektoren gehören zum Beispiel (z.B.) Adenoviren, Herpes-Simplex-Viren (HSV) oder Lentiviren, die jeweils spezifische Vor- und Nachteile für den Gentransport in MSCs bieten [26, 160]. Zu den bekanntesten Vertretern gehören die Adenoviren, die bisher vielversprechende Ergebnisse im genetischen Transfer ausgewählter Zielgene an MSCs lieferten [26, 158, 163]. Sie infizieren effizient sich teilende und nicht teilende Zellen und integrieren ihr Genom nicht in das der Zielzelle, wodurch sie nicht mutagen wirken [26, 158, 160]. In hohen Konzentrationen wirken sie potentiell immunogen, was durch die Elimination der dafür verantwortlichen kodierenden Sequenzen in modifizierten Generationen der Viren erfolgreich verhindert werden konnte [162, 164]. Andere Vertreter wie Lentiviren, aus der Familie der Retroviren, integrieren ihr Genom in das der Zielzelle und wirken dadurch potentiell mutagen. Außerdem kommt es somit bei der Verwendung von Retroviren oder HSV neben der Expression ausgewählter Wachstums- und Transkriptionsfaktoren weiterhin zur Expression viraler Gene [26, 165]. Zusammengefasst liefert der Gentransfer *ex* oder *in vivo* in MSCs eine Möglichkeit, den Problemen bei der Anwendung von Wachstumsfaktoren der Chondrogenese *in vivo* entgegen zu wirken, wobei nicht-virale und virale Vektoren verschiedene Vor- und Nachteile aufweisen [26].

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Einwegmaterialien

Mikrolanzette (20 Gauge)	Becton Dickinson GmbH, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Chambersslides (zwei Kammern)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einbettkassetten	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Einmalskalpelle	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Einmalhandschuhe, steril	Ansell Health Care, Anderlecht, Belgien
Einmalhandschuhe, unsteril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Faltenfilter	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen (10 µL)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen (100 µL)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen (1250 µL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kryo-Tubes (2 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikropistillen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikrotomklingen für Paraffinschnitte	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Objektträger (24 x 50 mm)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Objektträger-Deckplatten (24 x 50 mm)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pasteurpipetten	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Photometer-Küvetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (0,5-20 µL, 2-200 µL, 50-1000 µL)	Brandt, gekauft bei Laug & Scheller GmbH, Kürnach, Deutschland
Plastikpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
RT-PCR Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Spritzen (20 mL, 2 mL)	Becton Dickinson GmbH, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Spritzenfilter (0,20 µm)	Biotech GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Stahlmesser für Gefrierschnitte	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
SuperFrost® Objektträger (24 x 50 mm)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Tissue-Tek® (Cryomold Standard)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Wiegeschalen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zellkultur-Platten (6 well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur-Flaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Biologix Europe GmbH, Niederzier, Deutschland
Zellsieb (70 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

**Tabelle 2: Verwendete Einwegmaterialien mit Herstellerangaben**

### 2.1.2 Chemikalien

2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Trisbase)	Appllichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
2-Propanol (Isopropanol)	Appllichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
3-Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Appllichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Aceton	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

Alcianblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Aluminiumsulfat	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Ammoniak	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland
Chloralhydrat	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
dNTP-Mix	Biolone GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Ethanol (EtOH)	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Glycerol-Gelatine	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Adrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
HPLC-Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
ITS+1 Liquid Media Supplement	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

L-Ascorbat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
L-Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Methanol	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Natriumhydroxid	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Natriumiodid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Oil Red O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
PBS Dulbecco ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco mit Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Random Hexamere	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
β-Glycerophosphat	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Verdünnungspuffer für Antikörper	DCS, Hamburg, Deutschland

Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Xylol	Applichem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 3: Chemikalien mit Herstellerangaben**

### 2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze zur Zellkultur

<i>Medien für die Zellkultur:</i>	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/Ham's F-12	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
DMEM/High Glucose (4,5 g/L)	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S) (10000 U/mL)	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
<i>Zellkulturzusätze:</i>	
L-Ascorbatsäure (50 mg/mL)	in H <sub>2</sub> O dest. verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert
Dexamethason (1 mM)	in EtOH verdünnt, aliquotiert bei - 80°C gelagert
β-Glycerophosphat (1 M)	in H <sub>2</sub> O dest. verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert / SIGMA
IBMX (500 mM)	in DMSO verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert
Insulin (2 mg/mL)	in Essigsäure und H <sub>2</sub> O dest. verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert
Indomethacin (100 mM)	in DMSO verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert
Natriumpyruvat (100 mg/mL)	in H <sub>2</sub> O dest. verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert
L-Prolin (40 mg/mL)	in H <sub>2</sub> O dest. verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert

TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/mL)	in H <sub>2</sub> O dest. verdünnt, in Puffer aus Albumin und PBS gelöst, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert
100x ITS+1 Liquid Media Supplement	in destilliertem Wasser verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei - 20°C gelagert
<i>Medien zur Kultivierung und Differenzierung:</i>	
Adipogenes Differenzierungsmedium	DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 10% FCS 100 U/mL Penicillin/Streptomycin 1 $\mu$ M Dexamethason 500 $\mu$ M IBMX 1 $\mu$ g/mL Insulin 100 $\mu$ M Indomethacin
Chondrogenes Differenzierungsmedium	DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 100 U/mL Penicillin/Streptomycin 50 $\mu$ g/mL L-Ascorbat 100 nM Dexamethason 100 $\mu$ g/mL Pyruvat 40 $\mu$ g/mL L-Prolin 1% ITS+1 10ng/mL TGF- $\beta$ 1
Osteogenes Differenzierungsmedium	DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 10% FCS 100 U/mL Penicillin/Streptomycin 50 $\mu$ g/mL L-Ascorbat 10 mM $\beta$ -Glycerophosphat 100 nM Dexamethason
Osteogenes und adipogenes Kontrollmedium	DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 100 U/mL Penicillin/Streptomycin
Chondrogenes Kontrollmedium	DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 100 U/mL Penicillin 100 $\mu$ g/mL Streptomycin 50 $\mu$ g/mL L-Ascorbat 100 nM Dexamethason 100 $\mu$ g/mL Pyruvat 40 $\mu$ g/mL L-Prolin 1% ITS+1

Stammzellmedium (SCM)	DMEM/Ham's F-12 10% FCS 100 U/mL Penicillin/Streptomycin 50 µg/mL L-Ascorbat
Einfriermedium (EFM)	DMEM/Ham's F-12 50% FCS 10% DMSO

**Tabelle 4: Zellkulturmedien und Zusätze zur Zellkultur mit Herstellerangaben**

#### 2.1.4 Immunhistochemische Antikörper

Antigen	Hersteller	Verdünnung
<i>Osteogene Immunhistochemie:</i>		
Col Ia1 (Col I)	Abcam pls, Cambridge, Großbritannien	5 µg/mL
<i>Chondrogene Immunhistochemie:</i>		
Col IIa1 (Col II)	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland	5 µg/mL
Col Xa1 (Col X)	Abcam pls, Cambridge, Großbritannien	5 µg/mL

**Tabelle 5: Immunhistochemische Antikörper mit Herstellerangaben und der zur Färbung eingesetzten Verdünnung**

#### 2.1.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Hersteller	Verdünnung
<i>Antikörper für die durchflusszytometrischen Untersuchungen:</i>		
CD44 eFluor 450	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	0,2 mg/mL
CD73 PerCP-eFluor710	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	5 µL/Test
CD90 FITC	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	5 µL/Test
CD105 APC	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland	5 µL/Test

**Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie mit Herstellerangaben und der Verdünnung, in der diese geliefert wurden**

## 2.1.6 Enzyme

M-MLV Promega® Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
GoTaq® G2 Flexi DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Pronase E (1,95%)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Collagenase NB4 (1,25 U/mL)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
10x Trypsin-EDTA (0,05%)	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

**Tabelle 7: Verwendete Enzyme mit Herstellerangaben**

## 2.1.7 Primer der semiquantitativen RT-PCR

Alle verwendeten Primerpaare waren bereits im wissenschaftlichen Labor des König-Ludwig-Haus etabliert und bekannt.

Primergen	Sequenz des Primers (5'-3')	Annealing Temperatur (°C)	Produktgröße (bp)	Zykluszahl	MgCl <sub>2</sub>
<i>Haushaltsgen zur internen Kontrolle:</i>					
EEF1α	Sense: AGGTGATTATCCTG AACCATCC Antisense: AAAGGTGGATAGTC TGAGAAGC	54.0	234	21	1 x
<i>Adipogene Marker:</i>					
LPL	Sense: GAGATTTCTCTGTAT GGCACC Antisense: CTGCAAATGAGACA CTTTCTC	51.0	239	30	1 x
PPARγ	Sense:	61.0	297	35	1 x

	GCTGTTATGGGTGA AACTCTG Antisense: ATAAGGTGGAGATG CAGGCTC				
<i>Osteogene Marker</i>					
Col I	Sense: GGACACAATGGATT GCAAGG Antisense: TAACCACTGCTCCA CTCTGG	55.0	461	22	2 x
Col X	Sense: CCCTTTTTGCTGCT AGTATCC Antisense: CTGTTGTCCAGGTT TTCCTGGCAC	54.0	468	40	1 x
ALP	Sense: TGGAGCTTCAGAAG CTCAACACCA Antisense: ATCTCGTTGTCTGA GTACCAAGTCC	51.0	454	33	1 x
OC	Sense: ATGAGAGCCCTCAC ACTCCTC Antisense: GCCGTAGAAGCGC CGATAGGC	62.0	293	35	2 x
<i>Chondrogene Marker</i>					
AGG	Sense: GCCTTGAGCAGTTC ACCTTC Antisense: CTCTTCTACGGGGA CAGCAG	54.0	400	35	1 x

Col II	Sense: TTTCCCAGGTCAAG ATGGTC Antisense: CTTCAGCACCTGTC CACCA	51.0	155	31	1 x
Sox-9	Sense: ATCTGAAGAAGGAG AGCGAG Antisense: TCAGAAGTCTCCAG AGCTTG	60.0	263	31	1 x

**Tabelle 8: Primer mit Sequenzen, Annealing Temperatur, Produktgröße (bp), Zyklenzahl und eingesetzter MgCl<sub>2</sub> Konzentration**

EEF1 $\alpha$  = Elongation factor  $\alpha$ ; LPL = Lipoproteinlipase; PPAR $\gamma$  = Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$ ; Col I = Collagen Typ I; Col X = Collagen Typ X; ALP = Alkalische Phosphatase; OC = Osteocalcin; AGG = Aggrecan; Col II = Collagen Typ II; Sox-9 = sex determining region Y-box 9;

### 2.1.8 Lösungsmittel und Reagenzpuffer

<i>Lösungen für die Zellkultur und Differenzierung:</i>	
Collagenase NB4 (1,25 U/mL)	in PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> steril filtrieren und aliquotiert bei -20°C gelagert
1x PBS (pH = 7,4)	9,55 g PBS Dulbecco ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> gelöst in 1000 mL H <sub>2</sub> O bidest., pH der Lösung auf 7,4 einstellen
1x PBS/EDTA (pH = 7,4)	9,55 g PBS Dulbecco ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> 0,2 g EDTA gelöst in 1000 mL H <sub>2</sub> O bidest., pH der Lösung auf 7,4 einstellen
<i>Lösungen für Molekularbiologie:</i>	

10x Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE)	108 g Trisbase 55 g Borsäure 9,05 g EDTA gelöst in 1000 mL H <sub>2</sub> O bidest. pH der Lösung auf 8,4 einstellen
0,5x TBE	10x TBE 1:20 in H <sub>2</sub> O bidest. lösen
<i>Lösungen für die Histologie:</i>	
Hämatoxylin-Lösung	1 g Hämatoxylin gelöst in 1000 mL H <sub>2</sub> O bidest. 0,2 g Natriumiodid 50 g Aluminiumkaliumsulfat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure unter Schütteln lösen vor und nach Gebrauch steril filtrieren
1% Eosin	1 g Eosin gelöst in 100 mL H <sub>2</sub> O bidest. 1 Tropfen Essigsäure zugeben
4% Paraformaldehyd-Lösung	4 g Paraformaldehyd in 75 mL PBS lösen auf 60°C erhitzen und unter Rühren 5 min bei dieser Temperatur halten. Natriumhydroxid zugeben bis Lösung klar wird (circa (ca.) 100-150 µL) auf RT abkühlen lassen pH mit Salzsäure auf 7,4 einstellen mit PBS auf 1000 mL auffüllen
Oil Red O-Stammlösung	0,5 g Oil Red O in 100 mL 99% Isopropanol lösen
Oil Red O-Gebrauchslösung	Oil Red O-Stammlösung 6:4 in H <sub>2</sub> O bidest. lösen und 24 h bei RT lagern, vor Gebrauch filtrieren
Kernechtrot-Lösung	5g Aluminiumsulfat gelöst in 1000 mL Aqua bidest. erhitzen bis zum Kochen 0,1 g Kernechtrot hinzugeben nach Abkühlen filtrieren
Alcianblau-Lösung	0,25 g Alcianblau

	gelöst in 25 mL H <sub>2</sub> O bidest. pH auf 1,0 einstellen
1% Alizarinrot S-Lösung	0,25 g Alizarinrot S gelöst in 25 mL H <sub>2</sub> O bidest. 250 µL 25% Ammoniak pH auf 4,3-4,6 einstellen
<i>Lösungen für die Immunhistochemie:</i>	
Blockierungslösung für die endogene Peroxidase	1 mL 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gelöst in 9 mL PBS-Tween
0,1% PBS-Tween (PBST)	10 µL Tween 20 gelöst in 10 mL PBS
0,5% BSA/PBS	0,05 g BSA gelöst in 10 mL PBS aliquotiert bei - 20°C gelagert
<i>Lösungen für die durchflusszytometrische Untersuchung:</i>	
PBS/1% FCS Pre-Mix (Negativkontrolle)	1 µL FCS Gelöst in 99 µL 1x PBS (pH = 7,4)
Antikörper-PBS-Mischung	1,25 µL CD44 eFLuor 5 µL CD 73 PerCP 5 µL CD90 FITC 5 µL CD105 APC gelöst in 83,75 µL PBS/1% FCS Pre-Mix

**Tabelle 9: Lösungsmittel und Reagenzpuffer**

### 2.1.9 Bausätze und Kits

Nucleospin <sup>®</sup> RNA II isolation Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Tissue-Tek <sup>®</sup> O.C.T. <sup>™</sup> Compound	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
GelRED <sup>™</sup>	GeneON GmbH, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland
GoTaq <sup>®</sup> G2 Flexi DNA Polymerase Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland Inhalt: - GoTaq <sup>®</sup> G2 Flexi DNA Polymerase 5 U/µL - 5x Green GoTaq <sup>®</sup> Flexi Puffer

	- 25 mM MgCl <sub>2</sub>
100 bp-DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
VECTOR® NovaRED™ PEROXIDASE SUBSTRATE Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika Inhalt - VECTOR® NovaRED™ Reagenz 1 - VECTOR® NovaRED™ Reagenz 2 - VECTOR® NovaRED™ Reagenz 3 - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung
VECASTAIN® UNIVERSAL Elite® ABC KIT	Vector Laboratories Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika Inhalt: - VECASTAIN® Horse Normal Serum - VECASTAIN® biotynlierter universeller Antikörper - VECASTAIN® Reagenz A - VECASTAIN® Reagenz B
M-MLV Promega® Reverse Transkriptase Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland Inhalt: - M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/μL - 10x M-MLV Reverse Transkriptase Puffer

**Tabelle 10: Verwendete Bausätze und Kits mit Herstellerangaben**

### 2.1.10 Laborgeräte

Accu-jet pro Pipette	Brand, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Systec Laborautoklave V-75	Systec GmbH, Linden, Deutschland
AxioCam MRc Digitalkamera	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heracell 240i CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Glasware	Schott, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Kühlschrank	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland

Magnetrührer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Glas-Pipetten (bis 10 µL, bis 100 µL, bis 1000 µL)	ABIMED Analysetechnik GmbH, Langenfeld, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Laboratory Glasware, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Laborspülmaschine G7883	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Eismaschine	Manitowoc Crane Group Germany GmbH, Wilhelmshaven, Deutschland
Heraeus Instrumenten Heißluftsterilisator	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Heizblock	Boekel Scientific, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Objektträger Dunkelkammer	Simport Plastics Ltd., Beloil, Kanada
Elektrophorese Stromversorgung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Elektrophorese Kämme	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Elektrophorese Kammern	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermodrucker	Seico, gekauft bei LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
Thermocycler peqSTAR 2X	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Tiefkühltruhe - 20°C	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Tiefkühltruhe - 80°C	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Heraeus pico Biofuge Zentrifuge	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Heraeus fresco Biofuge Zentrifuge	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Heraeus HERAsafe Sicherheitswerkbank	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Wasserbad GFL-1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland

Mikroskop Axiovert 25, Axioskop, und Axioskop 2 MOT	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
IDL TRM-50 Rollenmischer	IDL GmbH & Co. KG, Nidderau, Deutschland
HM 500 OM Microm	MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland
Leica RM 1125RT Microm	Leica, Wetzlar, Deutschland
pH-Meter Inolab	WTW, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Kern 770 Feinwaage	Kern & Sohn GmbH, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Scaltec SPO 51 Waage	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Azure biosystems Imager c400	Azure biosystems, Dublin, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Mikro-Zentrifuge FugeOne®	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle Panasonic NN-3206	Panasonic Marketing Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland

**Tabelle 11: Laborgeräte mit Herstellerangaben**

### 2.1.11 Software

Azure biosystems c400 Analysis Software	Azure biosystems, Dublin, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Gel Analyzer Software 2010a	<a href="http://www.gelanalyzer.com/index.html">http://www.gelanalyzer.com/index.html</a>
NCBI Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed</a>
Photoshop Elements 4.0	Adobe, heruntergeladen über Universität Würzburg, Deutschland
FlowJo 10.5.3 Software	FlowJo, LLC, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

**Tabelle 12: Software mit Quellen- oder Herstellerangaben**

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation und Kultivierung der Zellen

#### 2.2.1.1 Isolation der Zellen aus den Nativgeweben

Mit dem Einverständnis der Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, sowie dem der ausgewählten Patienten, wurden insgesamt fünf Hüftköpfe mit Resten des Knorpels, Anteilen der anterioren Hüftgelenkscapsel sowie des LCF gewonnen. Die Gewebe stammten ausnahmslos von Frauen, im Alter von 40-55 Jahren (Durchschnittsalter 49 Jahre), die eine Totalendoprothese des Hüftgelenks über den anterioren Zugangsweg erhielten. Hierbei wurden alle der oben genannten (o.g.) Gewebearten routinemäßig entfernt. Somit wurden Zellen aus der Spongiosa, dem arthrotischen Gelenkknorpel, dem LCF und der anterioren Gelenkscapsel von fünf verschiedenen Spendern isoliert.

Die Isolierung und Aufarbeitung der gewonnenen Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die einzelnen Gewebe wurden aus dem Operationssaal direkt zu dem Laborarbeitsplatz transportiert und dort im Inkubator bei 37°C (95% Luft, 5% CO<sub>2</sub>) maximal für 2 h bis zur weiteren Verarbeitung zwischengelagert.

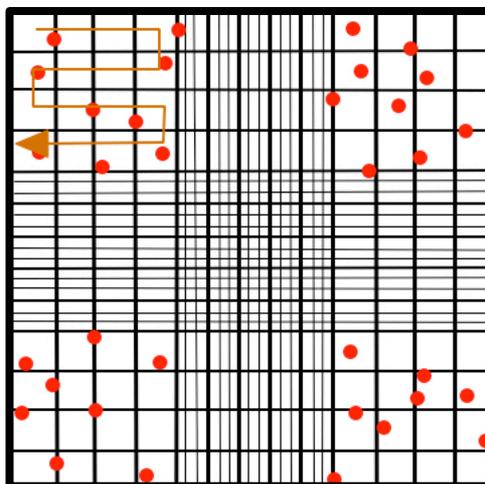
Die für die Isolation der Zellen verwendete Spongiosa wurde aus dem femoralen Reaming gewonnen oder mithilfe eines sterilen, scharfen Löffels aus dem Hüftkopf geschabt und zerteilt. Das LCF, sowie der vordere Anteil der Hüftgelenkscapsel und der Knorpel des Hüftkopfes, wurden mithilfe eines Skalpell zerkleinert, bis die einzelnen Stücke eine Größe von etwa 1-2 mm<sup>3</sup> erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt wurden je Gewebe auch zwei dieser zugeschnittenen Proben für eine spätere exemplarische Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung konserviert.

Im Folgenden wurden alle Gewebeproben, mit Ausnahme der Spongiosa, in ein 50 mL Zentrifugegefäß überführt. Das LCF, sowie die Gelenkscapsel wurden zum Collagenaseverdau jeweils mit 20 mL SCM, sowie 4 mL Collagenase 1,25 U/mL versetzt. Im Anschluss wurden die Proben über Nacht horizontal liegend und auf einem rotierenden Schüttelapparat bei 37°C im Inkubator gelagert. Das Knorpelgewebe wurde vor diesem Collagenaseverdau zusätzlich für 1 h mit 20 mL SCM und Pronase E 1,95% bei 37°C auf einem rotierenden Schüttelapparat im Inkubator gelagert, um eine bessere Degradierung der Proteinstruktur zu gewährleisten und es dem Collagenaseenzym so besser zugänglich zu machen.

Zum Stoppen des Collagenaseverdau wurde die Suspension über einen 70 µL Zellsieb in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen filtriert, bevor sie für 5 Minuten (min) bei 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert wurde. Am Boden bildete sich nun ein Zell-Pellet und die

Enzymlösung, die sich im Überstand befand, wurde mithilfe einer Pasteurpipette abgezogen. Die Zellen wurden abschließend in 20 mL SCM resuspendiert.

Die ausgeschabte Spongiosa wurde ebenfalls in Mengen von 10-20 mL in 50 mL Zentrifugegefäße überführt, die dann im ersten Schritt zum Waschen des Gewebes mit DMEM/Ham's F12 Medium auf 50 mL aufgefüllt wurden. Die Röhren wurden kräftig per Hand geschüttelt und im Anschluss für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Mithilfe einer Pasteurpipette wurde der Überstand abgesaugt, bevor das Röhren im zweiten Schritt mithilfe des DMEM/Ham's F12 Mediums wieder auf 50 mL aufgefüllt wurde. Nachdem das Gefäß erneut kräftig von Hand geschüttelt wurde, befanden sich die Zellen jetzt im Überstand, welcher in ein frisches 50 mL Zentrifugegefäß überführt wurde. Dieser zweite Schritt, bei dem die MSCs aus der Spongiosa gelöst wurden, konnte zwei- bis dreimal wiederholt werden und der gesammelte Überstand wie oben beschrieben in ein gemeinsames 50 mL Zentrifugegefäß überführt werden. Der gesammelte Überstand mit den darin befindlichen Zellen wurde dann für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, so dass sich am Boden des Gefäßes ein Zell-Pellet bildete. Der Überstand wurde abgesaugt und das sich am Boden des Röhrchens befindende Zell-Pellet wurde in 20 mL SCM resuspendiert. Die Auszählung der Zellzahl aller vier Gewebetypen erfolgte mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Abbildung 1).



**Abbildung 1** Beispielhaft dargestellte Auszählung (orange) der Zellen (rot) im linken oberen Eckquadrat einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop

Die 16 einzelnen Quadrate werden rasterförmig nach Zellen abgesucht. Zellen, die dabei überwiegend oder vollständig außerhalb der Begrenzungslinien eines Eckquadranten liegen, werden nicht gezählt und sind daher nicht dargestellt. Ein Viertel aller gezählten Zellen liefert den Mittelwert der Zellen innerhalb der vier Eckquadranten.

Dazu wurden jeweils 10  $\mu$ L der 20 mL Zellsuspension entnommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert, in das jeweils 40  $\mu$ L 1x PBS und 50  $\mu$ L Trypanblau vorgegeben wurden (Verdünnung 1:10). 10  $\mu$ L dieser Lösung (1:100 Verdünnung) wurden in eine Kammer

des Hämocytometers pipettiert, so dass sich die Gesamtzellzahl in 20 mL SCM wie folgt berechnet:

$$[\text{Mittelwert an Zellen aus den vier Eckquadranten}] \times [10^4] \times [10^2] \times [X]$$

mit  $10^4$  = Kammerfaktor; mit  $10^2$  = Verdünnungsrate; mit X = Gesamtvolumen an Zellsuspension

Die Anzahl an Zellen wurde nun so aufgeteilt, dass mindestens  $8 \times 10^8$  Zellen/175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät wurden. Wurde diese Zellzahl unterschritten, so wurde das Zellmaterial in einer 75 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät. Dazu wurde die entsprechende Menge an SCM in den Zellkulturflaschen vorgelegt, so dass die Gesamtmenge an SCM in den 175 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen 27 mL, sowie in den 75 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen 15 mL, betrug. Für die nächsten 1-2 Wochen wurde alle 3 Tage (d) ein Mediumwechsel durchgeführt bis die Zellen in der Kontrolle unter dem Mikroskop konfluierend den Boden der Zellkulturflasche zu 80-90% bedeckten.

#### 2.2.1.2 Ablösung und Kryokonservierung der Zellen

Zum Ernten der Zellen wurde das SCM vollständig und gründlich mit Hilfe einer Pasteurpipette abgezogen, da es sonst die Aktivität der Trypsinlösung hemmen könnte. Der Zellrasen wurde daraufhin mit 10 mL 1x PBS bedeckt und unter leichtem Schwenken der liegenden Zellkulturflasche gewaschen. Anschließend wurde das 1x PBS abgezogen und durch 0,25% Trypsin ersetzt, so dass die Zellen vollständig bedeckt waren. Im Anschluss folgte eine Lagerung bei 37°C im Inkubator für 5 min. Nachdem die Ablösung der nun rund erscheinenden Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert wurde, konnte die Wirkung der Enzymlyse durch Zugabe von der doppelten Menge an SCM gestoppt werden. Die gesamte Zellsuspension wurde daraufhin in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet in 20 mL SCM resuspendiert. Es erfolgte eine Zählung der Zellen mittels der Neubauer Zählkammer. Pro Kryotube sollten mindestens  $5 \times 10^5$  Zellen eingefroren werden. Nach der Zählung wurden die Zellen bis zur weiteren Verarbeitung bei 37°C im Inkubator zwischengelagert.

Das Einfriermedium (EFM) für die MSCs besteht aus 50% fetalem Kälberserum (FCS), 40% SCM und 10% DMSO, wovon pro Vial 1,5 mL benötigt wurde. Im Durchschnitt wurden pro Gewebe 2-3 Kryovials an MSCs gewonnen. Die Gesamtmenge an EFM wurde angesetzt, bevor die MSCs erneut für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in der benötigten Menge an EFM resuspendiert, sowie auf die einzelnen Vials aufgeteilt. Kryovials wurden im Anschluss sofort bei - 80°C tiefgefroren.

### 2.2.1.3 Auftauen der kryokonservierten Zellen

Nach der Isolierung und Vermehrung der Zellen wurden diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um die Zellen aufzutauen wurde zuerst 10 mL SCM in 15 mL Zentrifugenröhrchen vorgelegt und diese bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Inkubator zwischengelagert. Daraufhin wurden die gewünschten Kryotubes bei Raumtemperatur (RT) auf Eis liegend aufgetaut und mithilfe einer Pasteurpipette in das mit SCM gefüllte, o.g. 15 mL Zentrifugengefäß pipettiert. Nachdem die Suspension für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert wurde, konnte der Überstand abgezogen und das Zell-Pellet in 10 mL SCM resuspendiert werden. Es wurden 17 mL SCM in eine  $175\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche vorgegeben und die Zellen dann in dieser Flasche ausgesät. Nun erfolgte alle 3 d ein Mediumwechsel bis die Zellen den Flaschenboden zu 80-90% im konfluierenden Wachstum bedeckten. Daraufhin wurden sie wie beschrieben vom Flaschenboden abgelöst und in 20 mL SCM resuspendiert. Abschließend wurde die Anzahl der Zellen in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Um ausreichend Zellmaterial für einen Durchgang der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung der Zellen eines untersuchten Gewebetyps zur Verfügung stellen zu können, mussten mindestens  $3,2 \times 10^6$  isolierte Zellen pro untersuchtem Gewebe vorliegen.

### 2.2.2 Analyse der Oberflächenantigene

Um innerhalb der einzelnen Zellpopulationen mögliche Unterschiede in der Expression von Oberflächenantigenen nachzuweisen, die als charakteristisch für MSCs gelten, wurde eine Fluorescence-activated cell scanning (FACS)-Analyse durchgeführt. Dabei wurden Zellen, die aus den vier unterschiedlichen Geweben eines repräsentativ ausgewählten Spenders isoliert wurden, auf die Expression der Oberflächenantigene CD44, CD73, CD90 und CD105 untersucht. Die zuvor mit einem zum jeweiligen Antigen passenden Antikörper markierten Zellen wurden dabei durch einen fokussierten Laserstrahl bestrahlt. Die dabei von den einzelnen Zellen umgeleitete Strahlung wird maschinell ausgewertet und erlaubt somit eine Zählung und Klassifikation der untersuchten Zellen nach den o.g. Oberflächenmerkmalen. Zu Beginn wurde für jedes der untersuchten Gewebe eins der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kryotubes aufgetaut. Die darin enthaltenen Zellen wurden in SCM resuspendiert und in  $175\text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen ausgesät. Während regelmäßig ein Wechsel des SCM durchgeführt wurde, zeigte sich nach einigen Tagen ein konfluentes Wachstum der Zellen. Die Zellen wurden trypsiniert und in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen gesammelt. In Folge wurden diese mit 1x PBS gewaschen und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt. Die isolierten Zellen wurden anschließend in einer Neubauer Zählkammer gezählt

und im Anschluss in Mengen von jeweils mindestens  $5 \times 10^5$  Zellen in zwei 2,5 mL Eppendorf Gefäßen aufgeteilt. Zu einer dieser beiden Proben wurden 100 µL einer Antikörper-PBS-Mischung hinzugefügt. Diese Antikörper-PBS-Mischung bestand aus 83,75 µL eines PBS/1% FCS Pre-Mix, 5 µL CD 73 PerCP Antikörper, 1,25 µL CD44 eFLuor Antikörper, 5 µL CD105 APC Antikörper und 5 µL CD90 FITC. Zu der anderen Probe wurden lediglich 100 µL eines PBS/1% FCS Pre-Mix addiert. Diese Probe wurde als Negativkontrolle verwendet.

Beide Proben wurden nun gevortext und für 30 min bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 2 mL PBS/1% FCS Pre-Mix gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, bevor der Überstand über dem Zellpellet verworfen wurde. Nach der Resuspension der Zellen in 200 µL 2% Paraformaldehyd in 1x PBS wurden diese erneut für 15 min im Dunklen gelagert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 mL PBS/1% FCS Pre-Mix gewaschen, 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der dabei entstehende Überstand abgekippt. Nach der Zugabe von 200 µL PBS/1% FCS Pre-Mix wurden die Tubes erneut gevortext. Nun waren die suspendierten Zellen bereit für die FACS-Analyse. Die Messungen wurden mit der BD TM LSR II X durchgeführt und mittels der FlowJo 10.5.3 Software von FlowJo, LLC ausgewertet.

### 2.2.3 Multipotente Differenzierung der Zellen

Für den Nachweis der multipotenten Differenzierungsfähigkeit wurden Zellen aus allen vier Geweben der fünf Spender tripotent differenziert. Um das Differenzierungspotential der vier unterschiedlichen Zellpopulationen zu untersuchen, wurden spezifische Differenzierungsmedien und Kulturmethoden kombiniert. Dadurch konnten die Zellen adipogen, osteogen und chondrogen differenziert werden.

#### 2.2.3.1 Monolayer-Zellkulturen für die adipogene und osteogene Differenzierung

Zellen wurden mithilfe von Monolayer-Zellkulturen osteogen und adipogen differenziert. Für beide Differenzierungsrichtungen wurden dabei je zwei 6-well Platten mit jeweils drei Wells zur Differenzierung und drei Wells zur passenden Kontrollkultur mit Zellen beladen. Eine der 6-well Platten wurde im Anschluss für die histologische Auswertung verwendet, die andere 6-well Platte diente der molekulargenetischen Auswertung des Versuchs. Für die immunhistochemische Analyse der osteogenen Differenzierung wurden außerdem jeweils zwei der Zwei-Kammer CS pro untersuchtem Gewebe mit Zellen beladen. Dabei diente je eine Kammer zur Differenzierung und die andere Kammer zur dazugehörigen Kontrollkultur der Zellen.

Die aufgetauten und in 20 mL SCM resuspendierten Zellen konnten entsprechend der benötigten Zellzahl für die osteogene und adipogene Differenzierung aufgeteilt und in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt werden. Es wurden dabei  $3 \times 10^4$  Zellen/well, sowie  $5 \times 10^3$  Zellen/CS-Kammer eingesetzt. Für zwei 6-well Platten wurden also insgesamt  $3,6 \times 10^5$  Zellen, für die beide Zwei-Kammer CS insgesamt  $2 \times 10^4$  Zellen benötigt. Für beide Differenzierungsschritte zusammen ergibt sich daraus eine benötigte Gesamtzahl von  $7,4 \times 10^5$  Zellen. Nach dem Aussäen der Zellen wurde alle 2-3 d ein Wechsel des SCM durchgeführt, bis die Wells sowie die Kammern der CS nach etwa 5 d zu 60-70% konfluent bewachsen waren. Dafür wurden pro Well 2 mL und pro CS-Kammer 1,5 mL an SCM eingesetzt.

#### 2.2.3.1.1 Osteogene Differenzierung

Nachdem die einzelnen Wells, sowie die Kammern der CS zu 60-70% konfluent bewachsen waren, wurde das verwendete Medium gewechselt. Ein Teil der Zellen wurde mit osteogenem Differenzierungsmedium, der andere mit osteogenem Kontrollmedium bedeckt. Hierzu wurden dieselben Mengen an Medium pro Well (2 mL) oder CS-Kammer (1,5 mL) verwendet, wie zuvor beschrieben. Der Mediumwechsel wurde alle 3-4 d durchgeführt und das Wachstum beziehungsweise (bzw.) die Osteogenese der Zellen dabei unter dem Mikroskop beurteilt und dokumentiert. Nach 21 d wurde die Differenzierung beendet und die Zellkulturen wurden für die histologische, immunhistochemische sowie molekulargenetische Auswertung weiterverwendet.

#### 2.2.3.1.2 Adipogene Differenzierung

Nachdem die Zellen für die adipogene Differenzierung den Boden der Wells bzw. CS-Kammern zu 60-70% bedeckten, wurden sie mit adipogenem Differenzierungsmedium und Kontrollmedium versetzt. Die Mengen an Differenzierungs- und Kulturmedium pro Well (2 mL) und CS-Kammer (1,5 mL) wurden identisch zu den vorherigen Schritten gewählt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 d. Nach 21 d der Adipogenese wurden die Zellkulturen für die histologischen und molekulargenetischen Auswertungen weiterverarbeitet.

### 2.2.3.2 Pellet-Zellkulturen für die chondrogene Differenzierung

Anders als bei der osteogenen und adipogenen Differenzierung wurde die chondrogene Differenzierung in Pellet-Zellkulturen durchgeführt. Pro Gewebe wurden dafür je vier Pellets für die chondrogene Differenzierung und vier Pellets für die dazugehörigen Kontrollen verwendet. Jedes Pellet enthielt dabei  $3 \times 10^5$  Zellen, somit wurden für acht Pellets insgesamt  $2,4 \times 10^6$  Zellen benötigt.

Zunächst wurde die entsprechende Menge an Zellen aus den in 20 mL SCM Medium resuspendierten Zellen entnommen und in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand an SCM abgezogen wurde, und die Zellen anschließend in 20 mL serumfreiem DMEM/HAM's F-12 Medium resuspendiert und gewaschen wurden. Dieser Schritt wurde daraufhin wiederholt. Schließlich wurden die resuspendierten Zellen zu gleichen Teilen von 10 mL auf zwei 15 mL Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Im Anschluss wurden beide 15 mL Röhrchen erneut für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet in dem 15 mL Zentrifugenröhrchen, in dem sich die Zellen für die chondrogene Differenzierung befanden, wurde nun in 2 mL chondrogenem Differenzierungsmedium resuspendiert. Das Pellet in dem 15 mL Zentrifugenröhrchen für die späteren Kontroll-Pellets wurde in 2 mL des passenden Kontrollmediums resuspendiert. Jeweils 500  $\mu$ L dieser Zellsuspensionen wurden dann auf insgesamt vier 15 mL Zentrifugenröhrchen für die chondrogene Differenzierung und vier 15 mL Zentrifugenröhrchen für die dazugehörigen Kontrollen verteilt. Diese wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, bevor der Deckel um eine viertel Umdrehung aufgeschraubt wurde, um einen stetigen Sauerstoffzufluss zu gewährleisten. So wurden die Proben nun bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator gelagert.

#### 2.2.3.2.1 Chondrogene Differenzierung

Die Zellen für die chondrogene Differenzierung und ihre Kontrollen wurden für 27-28 d bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator gelagert. Nach etwa 3-4 d bildete sich am Boden der 15 mL Zentrifugenröhrchen ein in Differenzierungs- oder Kontrollmedium gebettetes Pellet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 d mithilfe einer Pasteurpipette, wobei hier sehr vorsichtig gearbeitet werden musste, um die Pellets nicht zu zerstören. Nach 27-28 d wurden die Pellets geerntet sowie histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch untersucht.

## 2.3 Histologische Untersuchungen

### 2.3.1 Fixieren und Einbetten der nativen Gewebeproben in Paraffin

Für die optische Analyse der vier verschiedenen nativen Gewebeproben, aus denen die Zellen isoliert wurden, sowie zur Untersuchung der unterschiedlichen Differenzierungswege der Zellreihen wurden histologische Färbungen durchgeführt.

Für eine erste Analyse der aus den vier verschiedenen Bereichen des Hüftgelenks gewonnenen nativen Gewebe wurden diese, wie im nächsten Kapitel beschrieben, mithilfe der HE Färbung dargestellt. Dazu mussten die Proben vorher fixiert und in Paraffin eingebettet werden. Zur Fixierung der Proben wurden die 1-2 mm<sup>2</sup> großen Gewebsschnitte von Knorpel, LCF und Kapsel sowie einzelne Spongiosa-Stücke 5 d in einem 15 mL Zentrifugenröhrchen in 5 mL 4% Paraformaldehyd eingelegt. Anschließend wurde bis zur Einbettung in Paraffin das 4% Paraformaldehyd abgezogen und gegen 5 mL 1x PBS ausgetauscht.

Für die weiteren Schritte wurden die nativen Gewebeproben dann in eine Kassette überführt und nach folgendem Protokoll, maschinell, durch das Durchlaufen verschiedener Lösungen, in Paraffin eingebettet:

Verweildauer in Lösung	Lösung	Temperatur
2 h	H <sub>2</sub> O dest.	RT
1 h	50% EtOH	RT
1 h	70% EtOH	RT
1 h	80% EtOH	RT
1 h	100% EtOH	RT
1 h	Isopropanol I	RT
1 h	Isopropanol II	RT
1 h	Isopropanol/Xylol (1:1)	RT
1 h	Xylol I	RT
1 h	Xylol II	RT
3 h	Paraffin I	60°C
3 h	Paraffin II	60°C

Abschließend wurden die nun in Paraffin eingebetteten nativen Gewebeproben aufgeblickt. Dazu wurden sie im ersten Schritt für 15 min bei 60°C in flüssigem Paraffin aufgewärmt. Daraufhin wurde eine kleine Metallschale zu 60% mit flüssigem Paraffin gefüllt, bevor die Proben mithilfe einer Pinzette aus den Einbettkassetten mit der Schnittfläche nach unten in der Mitte der Metallschale platziert wurden. Die Metallschale wurde dann auf eine 10°C

Kühlplatte gestellt und vor dem Aushärten mithilfe flüssigen Paraffins auf 90% des Volumens aufgefüllt. Die geblockten Proben kühlten für 4 h bei RT ab. Anschließend konnte die in Paraffin fixierten Proben aus der Metallschale entnommen werden und bei 4°C gelagert werden.

### 2.3.2 Schneiden und Entparaffinieren der nativen Gewebeproben

Die in Paraffin geblockte native Gewebeprobe wurde aus der Lagerung bei 4°C ohne Verzögerung in die Schneidemaschine eingespannt. Zunächst wurde die Schnittdicke auf 30-40 µm eingestellt und der Paraffinblock soweit geschnitten bis die Probe angeschnitten war. Dann wurde die Schnittdicke auf 4 µm zurückgestellt, um dünne Schnitte herstellen zu können. Die so angefertigten Schnitte wurden zum Strecken umgehend in ein warmes Wasserbad überführt und von dort auf einen Objektträger gezogen. Die Entparaffinierung der Proben erfolgte im Anschluss nach diesem Protokoll:

Verweildauer in Lösung	Lösung
5 min	Xylol I
5 min	Xylol II
1 min	96% EtOH I
1 min	96% EtOH II
1 min	70% EtOH
1 min	50% EtOH
	spülen in H <sub>2</sub> O dest.

### 2.3.3 HE-Färbung

Die HE Färbung gibt einen Überblick über den Aufbau der vier verwendeten Ursprungsgewebe. Das basische Hämalaun färbt dabei basophile Strukturen des Zellkerns, wie die Phosphorsäureketten der Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribosomen, blau. Das saure Eosin färbt azidophile Strukturen wie Collagenfasern oder andere aus Proteinen bestehende Strukturen rot. Folgendes Protokoll diente zur Färbung der entparaffinierten Proben:

Verweildauer in Lösung	Lösung
10 min	Hämalaun-Lösung
	spülen in H <sub>2</sub> O dest.
3 s	differenzieren in 0,25% HCl, 50% EtOH (1:1)
	spülen in H <sub>2</sub> O dest.
10 min	Leitungswasser
2 min	1% Eosin-Lösung
	spülen in H <sub>2</sub> O dest.
3 s	70% EtOH
3 s	95% EtOH
5 min	Isopropanol I
5 min	Isopropanol II
5 min	Xylol I
5 min	Xylol II

Abschließend wurden die Objektträger mit Entellan bedeckt und mit einem Deckglas bestückt, bevor sie unter dem Mikroskop ausgewertet wurden.

#### 2.3.4 Oil Red O-Färbung

Durch die Oil Red O-Färbung konnten die Monolayer-Zellkulturen der adipogenen Differenzierung und der dazugehörigen Kontrollen im Hinblick auf die Ausbildung fettgewebsspezifischer Merkmale verglichen werden. Die Oil Red O-Lösung färbt Triacylglyceride (TAGs), die den Bestandteil der für Adipozyten typischen Lipidtröpfchen bilden, rot an. Da intrazelluläre Lipidtröpfchen im Rahmen der Adipogenese der MSCs entstehen, gilt die positive Färbung als Marker für eine erfolgreiche adipogene Differenzierung der Monolayer-Zellkulturen nach 21 d. Durch eine Gegenfärbung mit Hämalaun wurden die Zellkerne blau gefärbt. Am Vortag der Färbung wurden sechs Teile der 0,5% Oil Red O-Stammlösung mit vier Teilen H<sub>2</sub>O dest. gemischt und über 24 h bei RT gelagert. Diese 0,3% Gebrauchslösung wurde vor Beginn der Färbung durch gießen über einen Papierfilter gesäubert. Die Fixierung und Oil Red O-Färbung der Proben erfolgte anhand des nachstehenden Protokolls:

Verweildauer in Lösung	Lösung
	waschen in 1x PBS
10 min	fixieren in 4% Paraformaldehyd
	waschen in H <sub>2</sub> O dest.
5 min	60% Isopropanol
10 min	0,3% Oil Red O-Gebrauchslösung
	waschen in 60% Isopropanol
	waschen in H <sub>2</sub> O dest.
3 min	Hämalaun-Lösung
24 h	trocknen der gefärbten Wells bei RT

Abschließend wurden die Zellen mit Glycerol-Gelatine eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Die gefärbten Wells der adipogenen Differenzierungen und Kontrollen wurden abschließend unter dem Mikroskop untersucht.

### 2.3.5 Alizarinrot S-Färbung

Mithilfe der Alizarinrot S-Färbung konnten die Monolayer-Zellkulturen der osteogenen Differenzierung und der dazugehörigen Kontrollen auf die Entwicklung spezifischer, osteogener Merkmale untersucht werden. Die Alizarinrot S-Färbelösung bildet mit Calcium-Ionen, die in Form von Calciumphosphat-Komplexen typischerweise einen Großteil der ausgehärteten, knöchernen EZM darstellen, eine rote Färbung. Eine positive Alizarinrot S-Färbung gilt also als Indikator für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung gefärbter MSCs. Die Fixierung und Färbung der MSCs wurde wie folgt durchgeführt:

Verweildauer in Lösung	Lösung
	waschen in 1x PBS
10 min	fixieren in eiskaltem Methanol
	waschen in H <sub>2</sub> O dest.
2 min	1% Alizarinrot S-Färbelösung
	drei Mal waschen in H <sub>2</sub> O dest.
24 h	trocknen bei RT

Nachdem die Zellen mit Glycerol-Gelatine benetzt und mit einem Deckglas bedeckt wurden, konnten die gefärbten Wells der osteogenen Differenzierung und Kontrollen abschließend unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

### 2.3.6 Kryokonservierung der Pellet-Zellkulturen

Für die histologische Auswertung der chondrogen differenzierten Pellets wurde jeweils eins der vier differenzierten Pellets und eins der dazugehörigen Kontrollkulturen anhand verschiedener Färbungen analysiert. Für diese Färbungen wurden Kryoschnitte der MPC-Pellets angefertigt. Hierfür wurde anfangs das jeweilige chondrogene Kontroll- oder Differenzierungsmedium aus den 15 mL Zentrifugenröhrchen abgezogen. Im Anschluss wurden die Pellets drei Mal in 1x PBS gewaschen. In den Deckel eines 1,5 mL Eppendorf Gefäßes wurde dann Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium vorgegeben. Die Pellets wurden nun kurz mit einer feinen Pinzette in 1% Eosin-Lösung getaucht, um sie anhand der roten Färbung besser innerhalb des Kryoschnitts identifizieren zu können. Anschließend wurden diese in das vorgegebene Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Medium im Deckel des 1,5 mL Eppendorf Gefäßes überführt. Abschließend wurde das Eppendorf Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu weiteren Untersuchungen bei - 20°C gelagert.

### 2.3.7 Kryoschnitte der MPC-Pellets

Zum Färben der kryokonservierten MPC-Pellets mussten nun Schnitte der tiefgefrorenen Pellet-Zellkulturen angefertigt werden. Der Innenraum des Schneideapparats wurde vor dem Arbeiten auf - 22°C heruntergekühlt. Die Temperatur der Klinge wurde zum Anfertigen sauberer Schnitte ebenfalls auf - 10°C eingestellt. Im nächsten Schritt wurden die bei - 20°C gelagerten Pellets, im Innenraum des Schneideapparats mitsamt des Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Medium-Blocks aus dem Deckel des 1,5 mL Eppendorf Gefäßes gelöst. Daraufhin wurden einige Tropfen Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound auf die Objekthalterung gegeben, bevor das fixierte Pellet darauf platziert wurde. Anschließend wurde das Pellet in 30 µm Schritten angeschnitten, bis die rote Färbung durch die 1% Eosin-Lösung zum Vorschein kam. Die Schnittdicke wurde dann auf 10 µm umgestellt, um Kryoschnitte für die spätere Färbung herzustellen. Die einzelnen Schnitte wurden dann auf SuperFrost® Objektträger gezogen und bis zur histologischen Färbung bei - 20°C tiefgefroren.

### 2.3.8 Alcianblau-Färbung

Durch die Alcianblau-Färbung konnten die Pellet-Querschnitte der chondrogen differenzierten Zellen und der dazugehörigen Kontrollen auf die Entwicklung chondrogener Merkmale untersucht werden. Die Gebrauchslösung färbt dabei negativ geladene Proteoglykane, die ein elementarer Bestandteil der EZM hyalinen Knorpels sind, cyan-blau. Daher ist eine positive, cyan-blaue Färbung sulfatierter, wasserbindender Proteoglykane ein Hinweis für die erfolgreiche chondrogene Differenzierung der Zellen. Die Färbung der Pellet-Querschnitte erfolgte nach diesem Protokoll:

Verweildauer in Lösung	Lösung
3 min	3% Essigsäure
30 min	1% Alcianblau-Lösung (pH = 1,0)
	waschen in H <sub>2</sub> O dest.
2 min	0,1% Kernechtrot-Lösung
	waschen in H <sub>2</sub> O dest.
3 s	70% EtOH
3 s	95% EtOH
5 min	Isopropanol I
5 min	Isopropanol II
5 min	Xylol I
5 min	Xylol II

Die Objektträger wurden im letzten Schritt mit Glycerol-Gelatine und einem Deckglas bedeckt und unter dem Mikroskop ausgewertet.

### 2.3.9 Immunhistochemische Untersuchungen

Für die Färbung spezifischer Antigene innerhalb der EZM des Knochen- und Knorpelgewebes in den osteogen und chondrogen differenzierten Zellen wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Hierfür wurden für die jeweiligen Antigene bestimmte Antikörper in den in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen verwendet. Die osteogen differenzierten Zellen und ihre Kontrollen wurden zuerst drei Mal in 1x PBS gewaschen, bevor sie für 10 min in eiskaltem Methanol fixiert wurden. Die immunhistochemische Färbung der chondrogenen Proben erfolgte an Kryoschnitten, die vor der Färbung für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert wurden. Die darauffolgenden Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung wurden

nach der Anleitung und mit den Zusätzen aus dem VECASTAIN® UNIVERSAL Elite® ABC KIT angefertigt. Die immunhistochemische Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Verweildauer in Lösung	Arbeitsschritt in Lösung
	drei Mal waschen in 1x PBS
	markieren der Zellumrandung mit Dako Pen
10 min	blocken der endogenen Peroxidase in 3% $H_2O_2$ (in PBST)
	drei Mal waschen in 1x PBS
30 min	blocken in 10% Blockierungslösung in PBST (VECASTAIN® UNIVERSAL Elite® ABC KIT)
1 h	inkubieren in primären Antikörper (Tabelle 4)
5 min	waschen in 1x PBS
30 min	inkubieren in sekundärem biotinylierten Antikörper in 1x PBS
5 min	waschen in 1x PBS

Die angewandte Methode der immunhistochemischen Färbung funktioniert nach der sog. ABC-Reaktion: Dabei bindet der antigenspezifische, primäre Antikörper an eine für ihn vorgesehene Struktur, deren Vorhandensein durch die Färbung qualitativ und quantitativ bewiesen werden soll. An diesen primären Antikörper bindet im nächsten Schritt der sekundäre, biotinylierte Antikörper. Das im biotinylierten Antikörper enthaltene Biotin-Molekül bildet starke Wechselwirkungen mit an Avidin gekoppelten Peroxidasen aus, die dann mithilfe des Vector® NovaRED™ PEROXIDASE SUBSTRATE KIT in einer roten Färbung dargestellt werden können.

Diese Färbung wurde direkt im Anschluss an die Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper anhand folgenden Protokolls umgesetzt:

Verweildauer in Lösung:	Arbeitsschritt in Lösung:
10 min	inkubieren in Vector® NovaRED™ PEROXIDASE SUBSTRATE KIT Peroxidase Lösung
	waschen in $H_2O$ dest.
5 min	Gegenfärbung in Hämalaun-Lösung
10 min	bläuen in Leitungswasser
1 min	waschen in $H_2O$ dest.

Abschließend wurden die Objektträger mit Entellan-Eindeckmedium bedeckt und mit einem Deckglas bestückt, bevor sie unter dem Mikroskop ausgewertet wurden.

#### 2.3.9.1 Immunhistochemische Collagen Typ I-Färbung

Für diese immunhistochemische Färbung der in CS-Kammern osteogen differenzierten MSC-Monolayer-Kulturen wurde ein primärer Antikörper verwendet, der an die  $\alpha$ 1-Peptidkette von Col I bindet. Diese fibrillären Collagenfasern, die sich unter anderem in der EZM von Knochengewebe und damit idealerweise auch in der von osteogen differenzierten Zellen finden, werden aus  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Propeptidketten gebildet, die sich zu einer Triple-Helix zusammen lagern.

#### 2.3.9.2 Immunhistochemische Collagen Typ II-Färbung

Bei der immunhistochemischen Darstellung von Col II in Pellet-Kulturen chondrogen differenzierter MSCs bindet der primäre Antikörper an die  $\alpha$ 1-Peptidkette von Col II. Drei dieser  $\alpha$ 1-Peptidketten lagern sich zu dem fibrillären Col II-Molekül zusammen. Col II bildet, ähnlich wie Col I im Knochengewebe, einen elementaren Bestandteil der EZM des hyalinen Gelenkknorpels und ist gemeinsam mit Proteoglykanen verantwortlich für dessen Beschaffenheit und biomechanische Belastbarkeit. Ein deutlicher Nachweis von Col II gilt als Hinweis für eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung der Zellen.

#### 2.3.9.3 Immunhistochemische Collagen Typ X-Färbung

Das Col X-Molekül wurde durch immunhistochemische Färbungen der chondrogen differenzierten Zell-Pellets und der Kontroll-Pelletkulturen nachgewiesen. Der primäre Antikörper für diese Färbung bindet ähnlich wie die vorherig genannten primären Antikörper an die  $\alpha$ 1-Peptidkette von Col X. Anders als Col I und Col II bilden Col X-Moleküle jedoch keine fibrilläre, sondern eine netzartige Struktur aus. Während der enchondralen Ossifikation wird es im Zuge des hypertrophen Wachstums postmitotischer Chondrozyten gebildet und gilt daher als ein geeigneter Marker einer hypertrophen und osteogenen Differenzierung im Rahmen der Chondrogenese von MSCs.

## 2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

### 2.4.1 Isolation des Zell-Lysats

Zum Ende der adipogenen und osteogenen Differenzierung nach 21 d, sowie zum Ende der chondrogenen Differenzierung nach 27 d erfolgte ein Vergleich der Genexpression spezifischer Markergene zwischen allen differenzierten Kulturen und den dazugehörigen Kontroll-Kulturen mittels semiquantitativer Real-Time Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Das Lysieren, sowie die Aufreinigung der RNA erfolgte mithilfe des Nucleospin<sup>®</sup> RNA II isolation kit der Firma Macherey-Nagel. Dazu wurden die Zellkulturen und Pellets mit einem Lysatpuffer bestehend aus  $\beta$ -Mercapthoethanol und RA1-Lösung aus dem Nucleospin<sup>®</sup> RNA II isolation kit (Verhältnis 1:100) versetzt, um die Zellmembran aufzuschließen und die messenger Ribonukleinsäure (mRNA) in ihrem Inneren freizulegen.

#### 2.4.1.1 Lysieren der Monolayer-Zellkulturen

Die Zellkulturen der adipogenen und osteogenen Differenzierung und ihre dazugehörigen Kontrollen wurden auf 6-well Platten kultiviert. Pro Gewebe wurde eine 6-well Platte in drei Wells zur Differenzierung und drei Wells zur Kontrolle aufgeteilt. Zum Lysieren der Zellen wurde das Differenzierungs- bzw. Kontrollmedium nach 21 d abgezogen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 500  $\mu$ L des Lysatpuffers in jedes der Wells gegeben. Danach wurden die Zellen durch mechanische Reibung mit einer Pipettenspitze vom Plattengrund gelöst, im Lysatpuffer suspendiert und jeweils in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß pipettiert. Die Zelllysate wurden sofort in flüssigem Stickstoff schock gefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert.

#### 2.4.1.2 Lysieren der Pellet-Zellkulturen

Die chondrogenen differenzierten Zellen sowie ihre passenden Kontrollen wurden in Form von Zell-Pellets in 15 mL Zentrifugenröhrchen kultiviert. Drei der vier differenzierten und undifferenzierten Pellets wurden im Anschluss für molekularbiologische Untersuchungen verwendet. Dafür wurde das chondrogene Differenzierungs- bzw. Kontrollmedium abgezogen und die Pellets in 1x PBS gewaschen. In zwei 1,5 mL Eppendorf Gefäßen wurden jeweils 350  $\mu$ L des Lysatpuffers vorgegeben. Nun konnten die dafür vorgesehenen Pellets in die dafür vorgesehenen 1,5 mL Eppendorf Gefäße überführt werden. Diese wurden abschließend im

Lysatpuffer durch eine Mikropistille zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schock gefroren, bevor sie bis zur weiteren Verwendung bei - 80°C gelagert wurden.

#### 2.4.2 RNA-Aufreinigung

Zur Aufreinigung des Zelllysats und der darin enthaltenen mRNA wurde, wie bereits erwähnt, das Nucleospin® RNA II isolation kit (Machery-Nagel) mit den enthaltenen Lösungen und Einwegmaterialien verwendet. Das Lysat wurde dafür auf Eis aufgetaut. Anfangs wurde in einem 2 mL Sammelgefäß dieselbe Menge an 70% EtOH vorgegeben, die vorher auch an Lysatpuffer verwendet wurde (350 bzw. 500 µL). Eine Filtereinheit wurde über dem 2 mL Sammelgefäß platziert. Das Lysat wurde auf die Filtereinheit pipettiert und dann 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Die Filtereinheit wurde nun verworfen und das Filtrat durch fünfmaliges auf- und abpipettieren vermischt. Im Anschluss wurde das Filtrat in mehreren Schritten auf eine Silicamembran, die erneut in einem 2 mL Sammelgefäß platziert wurde, pipettiert und 30 Sekunden (s) bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand im 2 mL Sammelgefäß wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Die mRNA bindet sich hierbei in Anwesenheit des Lysatpuffers an die Silicamembran. Diese wurde in der Folge in einem neuen 2 mL Sammelgefäß platziert, zum Trocknen und Entsalzen der Membran mit 350 µL Membrane desalting buffer (MDB) bedeckt und für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Dies diente einem besseren DNase-Verdau der im nächsten Schritt für 15 min bei RT folgte. Danach wurde die RNA in mehreren Schritten mit verschiedenen Puffern (RA2, RA3) gewaschen. Die Silicamembran wurde im Anschluss in einem Nuklease-freiem 1,5 mL Eppendorf Gefäß platziert. Zum Lösen der RNA wurden nun 50 µL RNase-freies H<sub>2</sub>O auf die Membran gegeben und die sich im 1,5 mL Eppendorf Gefäß befindliche Säule wurde, in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge, für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und das 1,5 mL Eppendorf Gefäß mit der darin enthaltenen mRNA sofort auf Eis gelagert.

Die Konzentration der hierbei isolierten mRNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektrometer bestimmt. Hierbei wurden zusätzlich Verunreinigungen der RNA, bspw. mit genomischer DNA, Proteinen oder Kohlenhydraten, durch die Bestimmung der Quotienten E<sub>260/280</sub> und E<sub>260/230</sub> angezeigt. Proteine absorbieren Licht der Wellenlänge 280 nm, wohingegen Kohlenhydrate Licht der Wellenlänge 230 nm absorbieren. Der Wert für den Quotienten E<sub>260/230</sub> sollte optimalerweise über 2,0 liegen. Der des Quotienten E<sub>260/280</sub> sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, wobei ein stark nach oben abweichender Wert für eine mögliche Proteinkontamination, ein stark nach unten abweichender Quotient für das Vorhandensein degradierter mRNA sprach. Abschließend wurde die mRNA bis zum Beginn der komplementären DNA (cDNA)-Synthese bei - 80°C gelagert.

### 2.4.3 cDNA-Synthese

Die in RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöste RNA wurde vor Beginn der cDNA-Synthese auf Eis aufgetaut. Anfangs wurde anhand der im Spektrometer bestimmten Konzentration der isolierten mRNA das für die cDNA-Synthese benötigte Volumen bestimmt, das 1 µg an mRNA entspricht. In ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß wurde nun die entsprechende Menge an HPLC-H<sub>2</sub>O vorgelegt, die mit diesem Volumen an gelöster mRNA zusammen 11 µL ergibt. Zu diesem Ansatz wurden nun 1 µL Random-Hexamere gegeben, so dass ein Endvolumen von 12 µL entstand. Das Gemisch wurde für 10 min in einem Heizblock auf 70°C erhitzt und in der Folge für 5 min auf Eis gelagert, wodurch es zur Denaturierung der enthaltenen DNA und zur Anlagerung der vorher zugegebenen Hexamere kommt, die später als Primer für die Reverse Transkriptase dienen sollten. Nachdem das vorbereitete 1,5 mL Eppendorf Gefäß kurz an zentrifugiert wurde, konnten dem Volumen nun 8 µL cDNA-Master Mix hinzugefügt werden. Dieser Master Mix besteht aus 4 µL 5x M-MLV Promega® Puffer, 1 µL 10mM dNTPs, 2 µL HPLC-H<sub>2</sub>O und 1 µL M-MLV Promega® Reverse Transkriptase.

Schließlich wurde das 1,5 mL Eppendorf Gefäß zuerst für 60 min in einem auf 42°C erhitzten Heizblock und dann für 10 min in einem auf 70°C erhitzten Heizblock gelagert, wodurch es durch die Enzymaktivität der Reverse Transkriptase zur Elongation und Synthese von cDNA-Einzelsträngen kommt. Der Versuchsansatz wurde erneut kurz an zentrifugiert und mithilfe von 30 µL HPLC-H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µL aufgefüllt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

### 2.4.4 Semiquantitative RT-PCR

Zur Auswertung der genetischen Expressionsmuster wurden die aus der isolierten mRNA erzeugten cDNA-Einzelstränge mithilfe der Promega® GoTaq-Polymerase sowie unterschiedlicher Primerpaare durch RT-PCR vervielfacht. Alle Zusätze, die im Rahmen der semiquantitativen RT-PCR verwendet wurden, wurden auf Eis aufgetaut.

Zu Beginn wurden für jede verwendete cDNA-Probe und eine Negativkontrolle, bestehend aus HPLC-H<sub>2</sub>O, jeweils 2129 µL eines PCR-Master Mix angesetzt. Dieser setzt sich aus 16,8 µL HPLC-H<sub>2</sub>O, 6 µL 5x Promega® GoTaq-Puffer, 3 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL 10 mM dNTPs, 1 µL 5 pmol/µL Primer forward, 1 µL 5 pmol/µL Primer reverse und 0,2 µL 5000U/mL Promega® GoTaq-Polymerase zusammen. Der PCR-Master Mix wurde nun für jede der Proben in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgegeben, bevor zu jedem der Ansätze 1 µL an cDNA oder HPLC-H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) hinzugegeben wurde. Die PCR-Tubes wurden kurz an zentrifugiert, bevor sie im Thermocycler platziert wurden, der ein spezifisches Programm für die

unterschiedlichen Primerpaare abrufen kann. Im Folgenden sind die Arbeitsschritte innerhalb des Thermocyclers aufgelistet:

Arbeitsschritt im Thermocycler	Temperatur (°C)	Dauer
primäre Denaturierung	94.0	3 min
Denaturierung	94.0	30 s
Bindung der Primer	51.0 - 62.0	30 s - 1 min (abhängig von Primer)
Elongationsphase	72.0	1 min
finale Elongation	72.0	5 min
Kühlen der Proben	12.0	ohne Limit

Die Arbeitsschritte von der Denaturierung bis hin zur Elongation wurden bis zu 40-mal (maximal 42 Zyklen) wiederholt, um eine ausreichend beurteilbare Bandenintensität in der Agarose-Gelelektrophorese zu erzielen. In Tabelle 6 sind die zur Bindung der Primer verwendeten Annealing Temperaturen dargestellt, die vor diesen Arbeitsschritt individuell im Thermocycler eingespeichert wurden.

#### 2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um die PCR-Produkte elektrophoretisch aufzutrennen, wurde ein 2%-Agarosegel mit einem Zusatz von GelRED™ verwendet. Im Anschluss konnte mittels der Azure biosystems c400 Analysis Software die Bandenstärken für die einzelnen Zielgene analysiert werden. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 2 g Agarose abgewogen, in einem Erlenmeyer-Kolben platziert und in 100 mL 0,5x TBE-Puffer gelöst. Um die Agarose vollständig im Puffer zu lösen, musste das Gemisch in einer Mikrowelle erhitzt werden. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurden 5 µL GelRED™ hinzugefügt und in eine Gelgießvorrichtung gegossen, in der Kämme eingesetzt wurden, um Laufkammern für die PCR-Produkte frei zuhalten. Das Gel wurde nun 30 min bei RT ausgehärtet und mit 0,5x TBE als Laufpuffer bedeckt. Vor der Gelelektrophorese wurde die erste Laufkammer mit 4 µL 100 bp-DNA-Leiter als Marker für die Molekülgröße der PCR-Produkte und alle weiteren Laufkammern mit jeweils 10 µL PCR-Produkt beladen. Die in das Gel geladenen PCR-Produkte wurden nun für 45 min bei 145 Volt aufgetrennt. Das Gel konnte nach der elektrophoretischen Auftrennung mithilfe der Azure biosystems c400 Analysis Software unter UV-Licht aufgenommen werden und im Anschluss daran durch die Gel Analyzer Software 2010a densitometrisch analysiert werden. Anhand der eingesetzten Menge

an cDNA, sowie der errechneten Unterschiede der Bandenintensitäten konnten so Rückschlüsse auf die relativen Veränderungen der Expression der spezifischen adipogenen, osteogenen oder chondrogenen Markergene gezogen werden. So konnten die im Rahmen der multipotenten Differenzierungswege aufgetretenen molekularbiologischen Veränderungen in der Expression spezifischer Markergene semiquantitativ mit denen der jeweiligen Kontroll-Gruppen verglichen werden.

#### 2.4.6 Statistische Auswertung

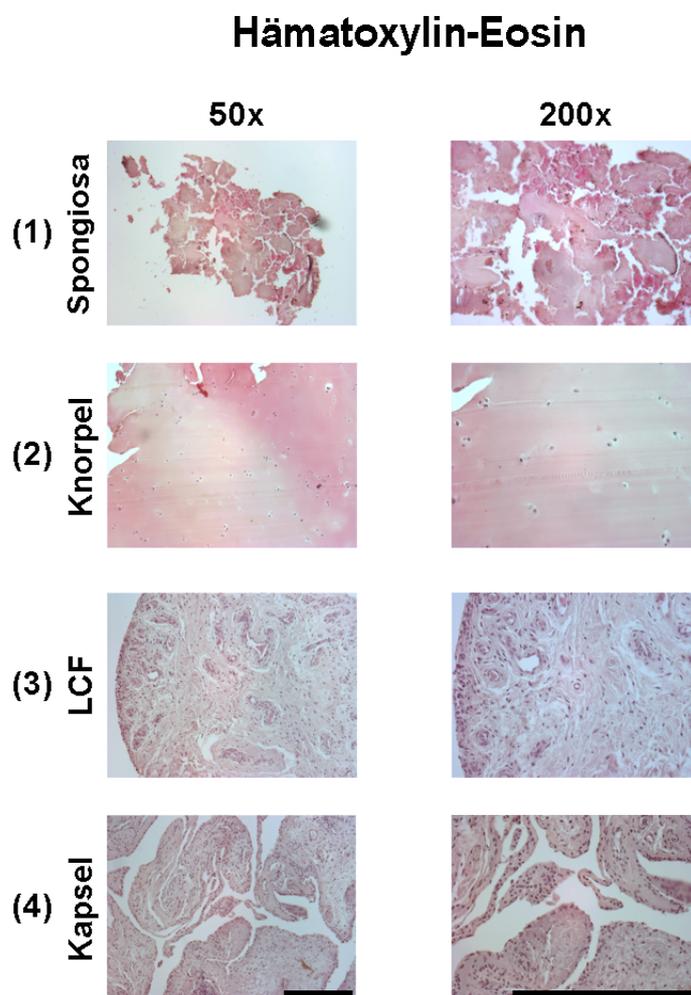
Die Daten der semiquantitativen RT-PCR wurden numerisch ausgewertet und unter Angabe des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung (SD) abgebildet. Dabei wurden insgesamt vier verschiedene Gewebe ( $n = 4$ ) von fünf verschiedenen Patienten ( $m = 5$ ) im Alter von 40 bis 55 Jahren (Durschnitt: 49 Jahre) ausgewertet. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt. Dabei galt  $p < 0,05$  als statistisch signifikant.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Isolation und Kultivierung der Zellen aus den Nativgeweben des Hüftgelenks

##### 3.1.1 HE-Färbung der Nativgewebe

Für die weiteren Versuche dieser Arbeit wurden BM-MSCs und MSC-ähnliche Zellen aus verschiedenen Nativgeweben des menschlichen Hüftgelenks isoliert. Zur Beurteilung des mikroskopischen Aufbaus und der Morphologie der einzelnen Gewebe wurden HE-Färbungen von 4 µm dicken Paraffinschnitten angefertigt.



**Abbildung 2** 50- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der HE-Färbung von beispielhaften Nativproben der Spongiosa (1), des Hüftgelenksknorpels (2), des LCF (3) und der Hüftgelenkskapsel (4).

Die einzelnen Nativgewebe des Hüftgelenks wurden zerkleinert und bis zur Einbettung in Paraffin in 4% Paraformaldehyd gelagert. Im Anschluss erfolgte eine HE-Färbung, anhand derer die Morphologie und der Aufbau der einzelnen Gewebe beurteilt werden konnte. Kleiner Skalierungsbalken (50x): 300 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 300 µm.

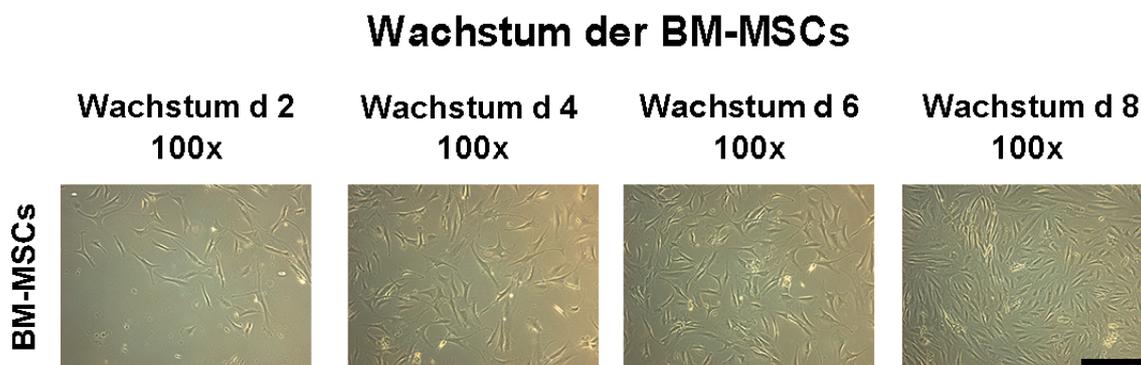
Die Aufnahme eines Ausschnitts aus der Spongiosa des femoralen Knochens (Abbildung 2, 1) zeigte beispielhaft den Aufbau des Gewebes aus mineralisierten Knochenbälkchen und Knochenplättchen. Dieses gefäßlose, knöcherne Gerüst wird von Osteozyten und ihren langen Zellausläufern, die in einem Netzwerk von kleinen Canaliculi verlaufen, gebildet. Ihre Zellkerne waren in der hier abgebildeten Färbung, nur schemenhaft basophil gefärbt, im Inneren der Knochenplättchen zu erkennen. Die Form der Knochenbälkchen ergibt sich durch die aus fibrillären, mineralisierten Collagenfasern bestehende und die Osteozyten umgebende EZM, die in der HE-Färbung rötlich erscheint. Der Großteil der Collagenfasern wird von Col I gebildet und gewährleistet die hohe Stabilität sowie Belastbarkeit des Knochens unter Druck- und Zugkräften.

Das zweite Präparat (Abbildung 2, 2) zeigte einen Ausschnitt des arthrotisch veränderten hyalinen Gelenkknorpels des Hüftgelenks, der die knöchernen Anteile des Femurs und das Acetabulum bedeckt. Innerhalb des hyalinen Knorpels sind mehrere Chondrone, gebildet aus Chondrozyten und den sie umgebenden Knorpelhof, erkennbar (Abbildung 2, 2). Diese Knorpelhöfe entstehen artifiziell während der Färbung und Fixierung des hyalinen Knorpels. Umgeben sind diese Chondrone von einer EZM, die im gesunden Knorpel aufgrund der darin enthaltenen Proteoglykane basophil erscheint. Auffällig ist die schwache Basophilie der EZM (Abbildung 2, 2). Der bindegewebige Anteil der EZM des Knorpels besteht überwiegend aus Col II-Molekülen, sowie kleineren Anteilen von Collagen Typ IX (Col IX) und Collagen Typ XI (Col XI), die senkrecht zur Knorpeloberfläche ausgerichtet sind. Die eingelagerten basophilen Proteoglykane dienen als Wasserspeicher und gewährleisten somit die Elastizität des Knorpelgewebes.

Beim LCF (Abbildung 2, 3), sowie der anterioren Hüftgelenkscapsel (Abbildung 2, 4) handelt es sich um straffes, parallelfasriges bzw. geflechtartiges Bindegewebe, das von einer Vielzahl kleiner Gefäße durchzogen wird. Typisch für straffes Bindegewebe sind Fibroblasten, deren Zellkerne sich in beiden Präparaten basophil darstellen, die von einer EZM aus dichten, in Zugrichtung ausgebildeten Collagenfasern umgeben sind. Col I bildet den Großteil dieser Collagenfasern, die im Fall des parallelfasrigen Bindegewebes (Abbildung 2, 3) in eine und im Falle des geflechtartigen Bindegewebes (Abbildung 2, 4) in verschiedene Zugrichtungen ausgerichtet sind. Das LCF führt außerdem die Arteria capitis femoris, einen Zweig der Arteria obturatoria, mit sich, die zur Versorgung des Hüftkopfs dient, aber innerhalb des Präparates nicht klar abgrenzbar war (Abbildung 2, 3). Sowohl das LCF (Abbildung 2, 3), als auch die Gelenkscapsel (Abbildung 2, 4) sind außerdem von einer Synovialmembran überzogen. Zusammenfassend zeigten sich außer im bekanntermaßen vorgeschädigten hyalinen Knorpelgewebe keine auffälligen Pathologien oder Abweichungen vom bekannten histologischen Bild der vier verwendeten Gewebe in der HE-Färbung.

### 3.1.2 Wachstum und Morphologie der Zellen

Nach der Isolation der nativen, undifferenzierten BM-MSCs und MSC-ähnliche Zellen aus dem Knorpel, dem LCF und der Gelenkkapsel des Hüftgelenks wurden diese, je nach gewonnener Zellzahl, in 175 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät (Passage 0). Bereits nach 2 d konnte anhand einzelner, adhärent wachsender Zellen eine für MSCs charakteristische Fibroblasten-artige, spindelförmige Morphologie beobachtet werden (Abbildung 3, a). Zusätzlich fanden sich im überstehenden SCM auch nicht-adhärent wachsende Zellen, die jedoch mit der zunehmenden Anzahl an Mediumwechseln immer seltener wurden. Durch die Kultivierung in SCM zeigte sich eine Proliferation der Zellen, die nach etwa 8 d mit der Ausbildung eines konfluent wachsenden Zellrasens einherging (Abbildung 3, d 8).



**Abbildung 3** Aufnahme des Wachstums der plastik-adhärenent wachsenden BM-MSCs aus Spongiosa in Monolayer-Zellkulturen unter dem Phasenkontrast-Mikroskop in 100-facher Vergrößerung.

Zu sehen ist die Proliferation der MSCs in Primärkultur mit der für sie typischen Fibroblasten-artigen, spindelförmigen Morphologie nach 2, 4, 6 und 8 d in 175cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen während der Passage 0. Skalierungsbalken (100x): 100 µm.

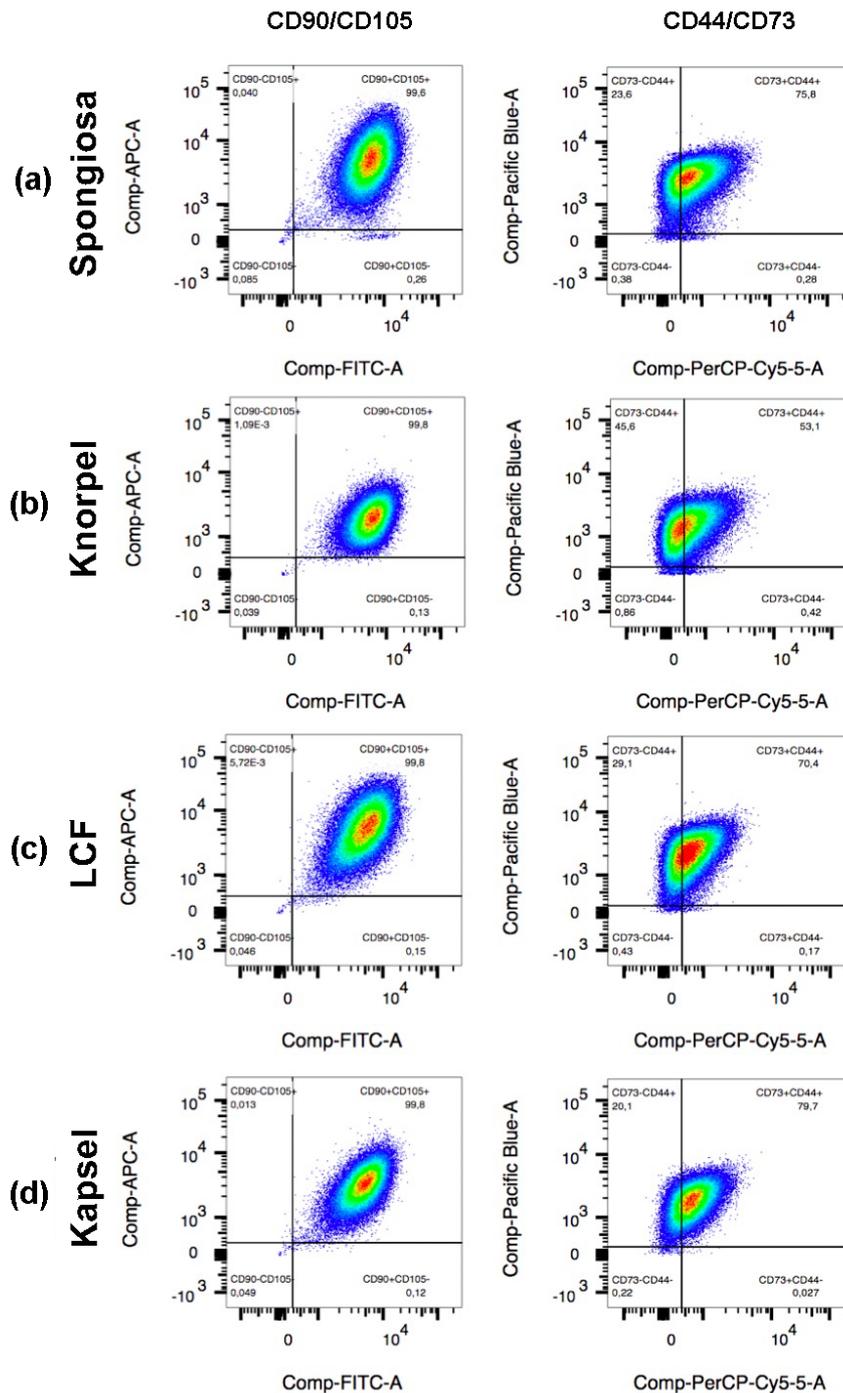
Bedeckte der konfluent wachsende Zellrasen 80-90% des Flaschenbodens, wurden die BM-MSCs abgelöst und in einem Verhältnis von  $6,5 \times 10^6$  Zellen/1,5 mL EFM bei - 80°C in 2-3 Kryovials kryokonserviert. Es fanden keine weiteren Passagen der Zellkulturen statt, so dass für die folgenden Versuche lediglich MSCs aus primären Passagen verwendet wurden.

### 3.2 FACS-Analyse der Oberflächenantigene

Zellen, die aus den vier Ursprungsgeweben eines exemplarisch gewählten Patienten isoliert wurden, konnten mithilfe der FACS-Analyse auf die Expression von Oberflächenantigenen getestet werden, die als charakteristisch für MSCs gelten. Dadurch sollten beispielhaft

mögliche Unterschiede in der Expression der Oberflächenantigene CD 44, CD73, CD90 und CD105 zwischen BM-MSCs und den MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpel, LCF und Kapselgewebe dargestellt werden. Dafür wurden mindestens  $5 \times 10^5$  der aus den einzelnen Nativgeweben eines Patienten isolierten Zellen auf die Expression der für MSCs obligaten Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105, sowie des Antigens CD44 untersucht. Die Ergebnisse der dafür durchgeführten FACS-Analyse wurden maschinell ausgewertet (Abbildung 4) und zwischen den Nativgeweben der isolierten Zellen miteinander verglichen.

## FACS-Analyse ausgewählter CD-Antigene



**Abbildung 4** Beispielhaft dargestellte durchflusszytometrisch ermittelte Verteilung der Co-Expression der Oberflächenantigene CD90/CD105 und CD73/CD44 der isolierten Zellen aus Spongiosa (a), Knorpel (b), LCF (c) und der Kapsel (d) der Hüftgelenke.

Die aus den Nativgeweben isolierten Zellen wurden einmal passagiert und bis zur Konfluenz in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Im Anschluss wurden mindestens 5x10<sup>5</sup> der isolierten Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenantigene CD44, CD73, CD90 und CD105 untersucht. Die Ergebnisse wurden mittels der FlowJo 10.5.3 Software von FlowJo LLC analysiert.

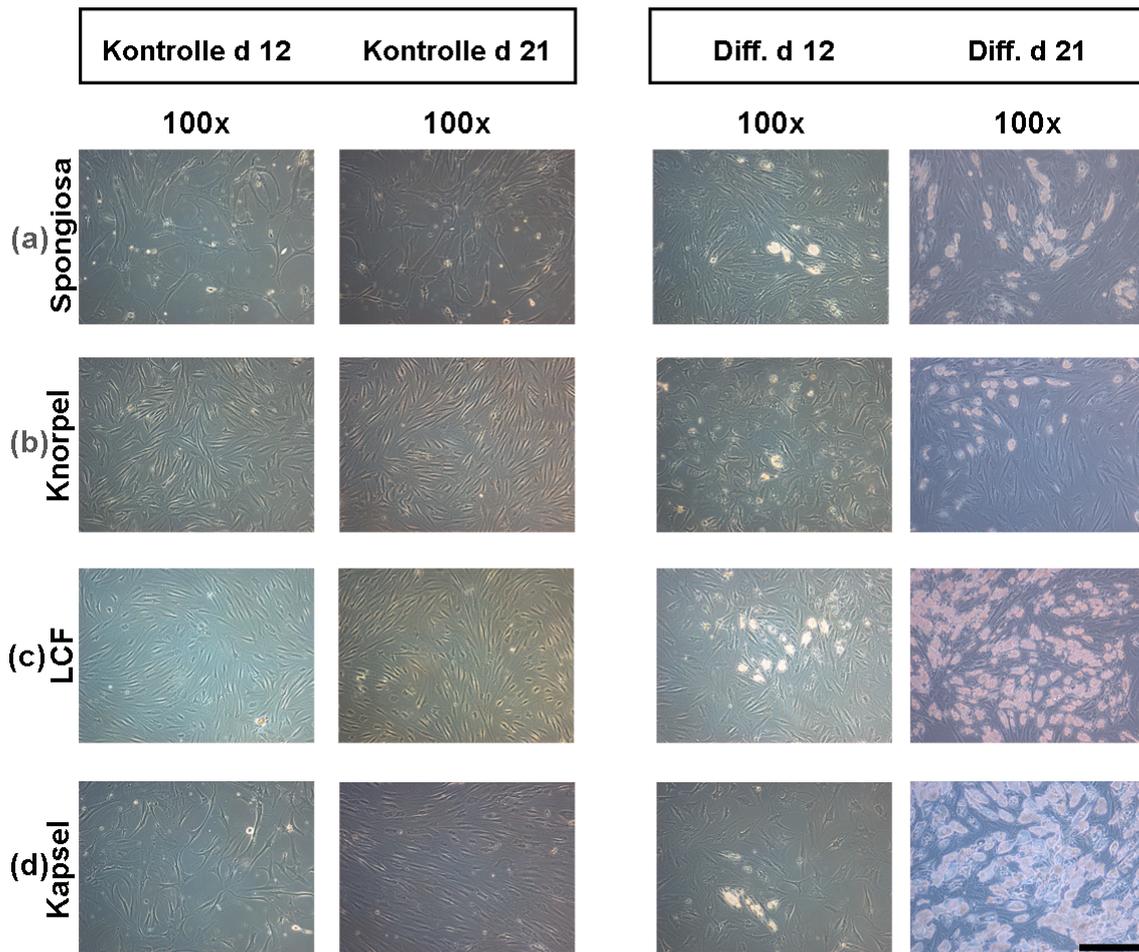
Alle der untersuchten Zellpopulationen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel des Hüftgelenks waren deutlich positiv für die untersuchten Oberflächenantigene CD44, CD73, CD90 und CD105 (Abbildung 4, a-d). Unabhängig von den Nativgeweben, aus denen die Zellen isoliert wurden, waren jeweils  $\geq 95\%$  der Zellen positiv für die Antigene CD44, CD90 und CD105. Obwohl auch der Großteil der Zellen positiv für das Oberflächenantigen CD73 waren, zeigten sich für die Expression dieses Oberflächenmarkers niedrigere Werte: Zellen aus Spongiosa (79,7%), Knorpel (76,0%) und Kapsel (70,6%) waren zu jeweils  $\geq 70\%$  positiv für CD73, während etwas mehr als die Hälfte der aus dem LCF (53,5%) isolierten Zellen eine Expression des Oberflächenmarkers CD73 zeigten (Tabelle 13, CD73<sup>+</sup>). Die untersuchte Co-Expression der Oberflächenmarker CD90/CD105 und CD73/CD44 ergab ein ähnliches Bild. Nahezu alle der CD90 positiven Zellen zeigten auch eine Expression des Oberflächenantigens CD105 und umgekehrt (Abbildung 4, CD90/CD105). Der prozentuale Anteil der Zellen mit einer Co-Expression von CD73/44 lag nur minimal unter dem Anteil der rein CD73 positiven Zellen (Abbildung 4, CD44/CD73). Somit exprimierte der Anteil der Zellen der CD73 positiven Zellen nahezu immer auch das Antigen CD44 (Abbildung 4, CD44/73).

### **3.3 Adipogene Differenzierung**

#### **3.3.1 Mikroskopische Unterschiede im Rahmen der adipogenen Differenzierung**

Die adipogene Differenzierung fand für 21 d in dem dafür vorgesehenen adipogenen Differenzierungsmedium in Monolayer-Zellkulturen statt. Für denselben Zeitraum wurden Negativkontrollen in einem adipogenen Kontrollmedium inkubiert. Das Wachstum sowie die Differenzierung der Zellen wurden über diesen Zeitraum, anhand morphologischer und struktureller Veränderungen zu ausgewählten Zeitpunkten, unter einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt (Abbildung 5).

## Adipogene Differenzierung



**Abbildung 5** 100-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der adipogenen Differenzierung (Diff.), sowie der dazugehörigen Negativkontrollen (Kontrolle) der Zellen aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und anteriorer Hüftgelenkskapsel (d) nach 12 und 21 d.

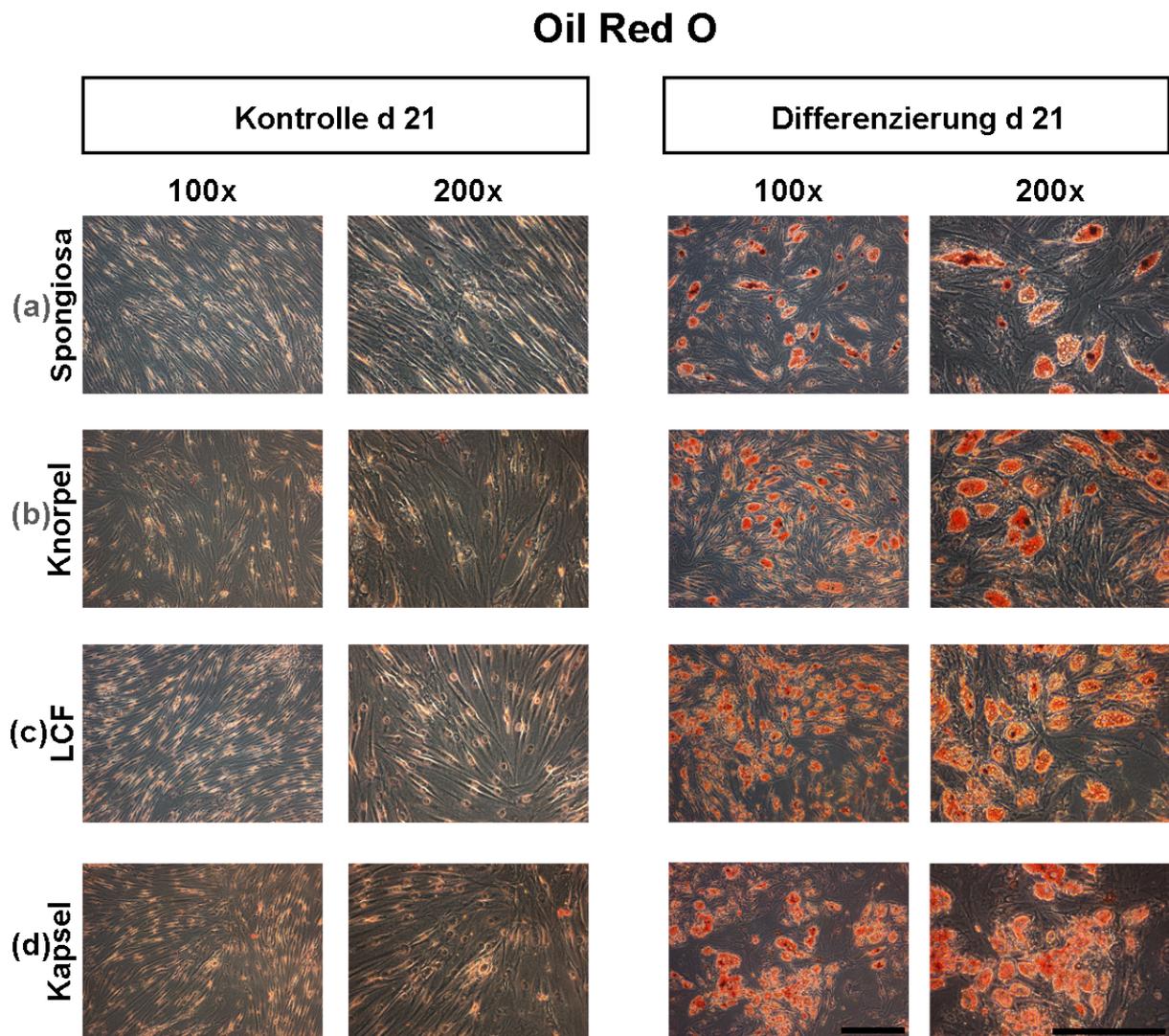
Die differenzierten MSCs sowie die dazugehörigen Negativkontrollen wurden für 21 d im passenden Differenzierungs- oder Kontrollmedium in Monolayer-Kulturen inkubiert. Die Morphologie und das Wachstum der Zellen wurden nach 12 und 21 d unter dem Lichtmikroskop miteinander verglichen. Skalierungsbalken (100x): 100 µm.

Die Negativkontrollen der jeweiligen Gewebe zeigten zu beiden Zeitpunkten einen für MSCs typisch spindelförmigen Zellaufbau in längs gerichteter Anordnung. Hier kam es zwischen 12 und 21 d lediglich zur Proliferation der Zellen, die schließlich konfluent den Boden der Zellkulturflasche bedeckten (Abbildung 5, Kontrolle d 21).

In den im adipogenen Differenzierungsmedium kultivierten Zellen zeichneten sich im Vergleich dazu, sowohl am d 12 (Abbildung 4, Diff. d 12), als auch am d 21 (Abbildung 5, Diff. d 21) deutliche Veränderungen ab: Nach 12 d bildeten sich bereits vereinzelt kleine, intrazellulär gelegene Vakuolen ab (Abbildung 5, Diff. d 12), deren Anzahl bis nach 21 d deutlich zunahm (Abbildung 5, Diff. d 21).

### 3.3.2 Oil Red O-Färbung der Monolayer-Zellkulturen

Durch die Oil Red O-Färbung konnten anhand einer Rotfärbung intrazellulär gelegene Lipidtröpfchen histologisch dargestellt werden. Durch die Darstellung der Anreicherung intrazellulärer TAGs kann anhand dieser Färbung die adipogene Differenzierung in MSCs aus den vier unterschiedlichen Ursprungsgeweben im Vergleich zu ihren Negativkontrollen optisch dargestellt werden (Abbildung 6).



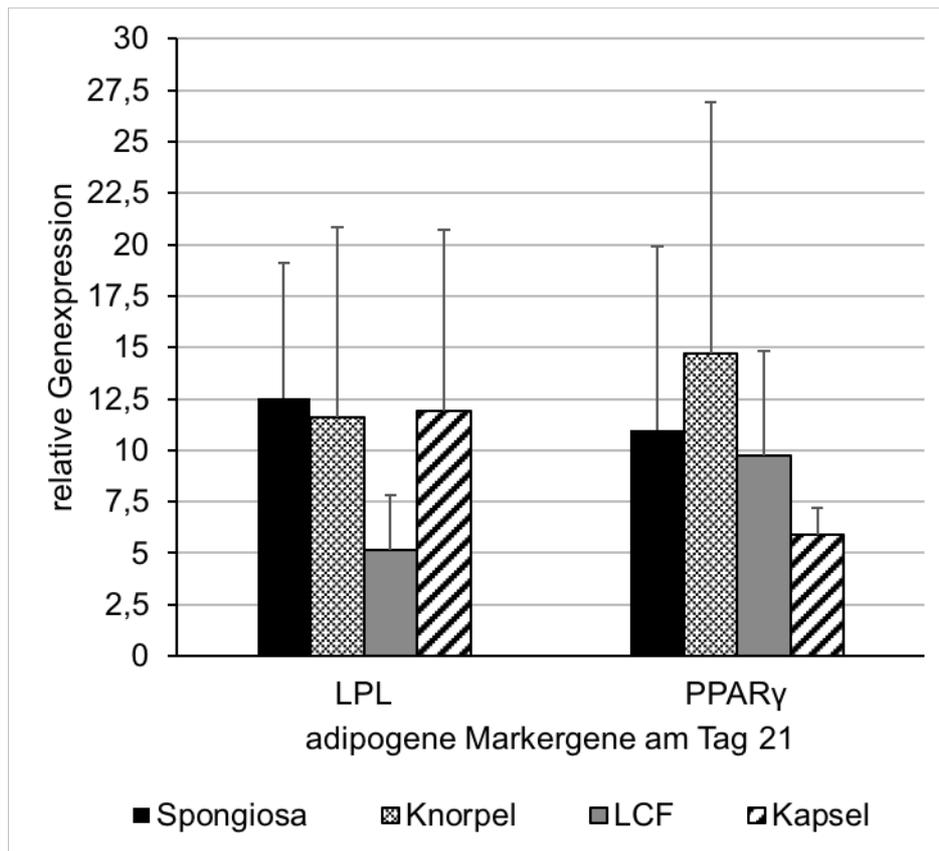
**Abbildung 6** 100- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der histologischen Oil Red O-Färbung der Negativkontrollen (Kontrolle d 21) und adipogen differenzierten (Differenzierung d 21) der Zellen aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und anteriorer Hüftgelenkskapsel (d).

Die Adipogenese der Zellen wurde für 21 d in Monolayer-Zellkulturen durchgeführt. Die adipogene Differenzierung der Zellen wurde am d 21 mithilfe der Oil Red O-Färbung unter dem Mikroskop ausgewertet und mit den Negativkontrollen verglichen. Kleiner Skalierungsbalken (100x): 100 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 20 µm.

Die Negativkontrollen aller Gewebslinien zeigten nach 21 d keinen positiven Nachweis adipogener Merkmale in der Oil Red O-Färbung bei Kultivierung in dem adipogenen Kontrollmedium (Abbildung 6, Kontrolle d 21). Im adipogenen Differenzierungsmedium kultivierte BM-MSCs und MSC-ähnliche Zellen zeigten, unabhängig vom Nativgewebe aus denen sie isoliert wurden, eine deutlich positive Oil Red O-Färbung (Abbildung 6, Differenzierung d 21) als Nachweis rot gefärbter TAGs. Die Ansammlungen von TAGs stellten sich, wie in den nativen Aufnahmen beschrieben (Abbildung 5, Diff. d 21), als kleine, lipidgefüllte Vakuolen innerhalb der Zellen dar (Abbildung 6, Differenzierung d 21).

### 3.3.3 Semiquantitative RT-PCR adipogener Markergene

Mittels semiquantitativer RT-PCR konnten die durch die adipogene Differenzierung hervorgerufenen molekularbiologischen Veränderungen verstärkt und mittels der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Um einen Vergleich der relativen Genexpression zwischen differenzierten Kulturen und Negativkontrollen zu ermöglichen, erfolgte eine densitometrische Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese-Banden. So konnten für alle der differenzierten Zellgruppen sowohl die Mittelwerte als auch die dazugehörige SD der relativen Veränderung in der Expression der adipogenen Markergene LPL und PPAR $\gamma$  im Vergleich zu den Kontrollgruppen berechnet werden. Die Fehlerbalken bilden dabei die dazugehörigen Standardabweichungen ab (Abbildung 7).



**Abbildung 7** Mittelwerte  $\pm$  SD der über semiquantitative RT-PCR ermittelten relativen Genexpression der adipogenen Markergene LPL und PPAR $\gamma$  in den differenzierten Kulturen von BM-MSCs und MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpel, LCF und Kapsel im Vergleich zu ihren Negativkontrollen.

Die Adipogenese der Zellen aller Ursprungsgewebe erfolgte über 21 d in adipogenem Differenzierungsmedium und Kontrollmedium in Monolayer-Zellkulturen. Am Tag 21 erfolgte eine semiquantitative Bestimmung der für die adipogene Differenzierung spezifischen Markergene LPL und PPAR $\gamma$  mittels semiquantitativer RT-PCR.

Die Auswertung der relativen Genexpression für die Markergene LPL und PPAR $\gamma$  zeigte nach 21 d eine deutliche Steigerung der Expression in adipogen differenzierten Zellen aus allen untersuchten Geweben (Abbildung 7). Die Mengen gebildeter Genprodukte für LPL zeigten sich für BM-MSCs und MSC-ähnliche Zellen aus Knorpel und Kapsel nahezu identisch. Lediglich die differenzierten Zellen aus dem LCF zeigten im Mittel eine etwas schwächere Steigerung der Genexpression für LPL im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollen (Abbildung 7, LPL). Die differenzierten MPCs aller Gewebe zeigten im Vergleich zu den Negativkontrollen nach 21 d ebenfalls einen starken Anstieg der mRNA-Produktion des Gens PPAR $\gamma$ . Auffällig war die etwas schwächere mittlere, relative Genexpression von PPAR $\gamma$  in adipogen differenzierten MSC-ähnlichen Zellen aus der Hüftgelenkskapsel, während diese in differenzierten MSC-ähnlichen Zellen aus dem Knorpelgewebe stärker ausfiel (Abbildung 8, PPAR $\gamma$ ). Die benannten Unterschiede in der Expression der Markergene LPL und PPAR $\gamma$  zwischen den differenzierten Subpopulationen von Zellen waren nicht signifikant. Die

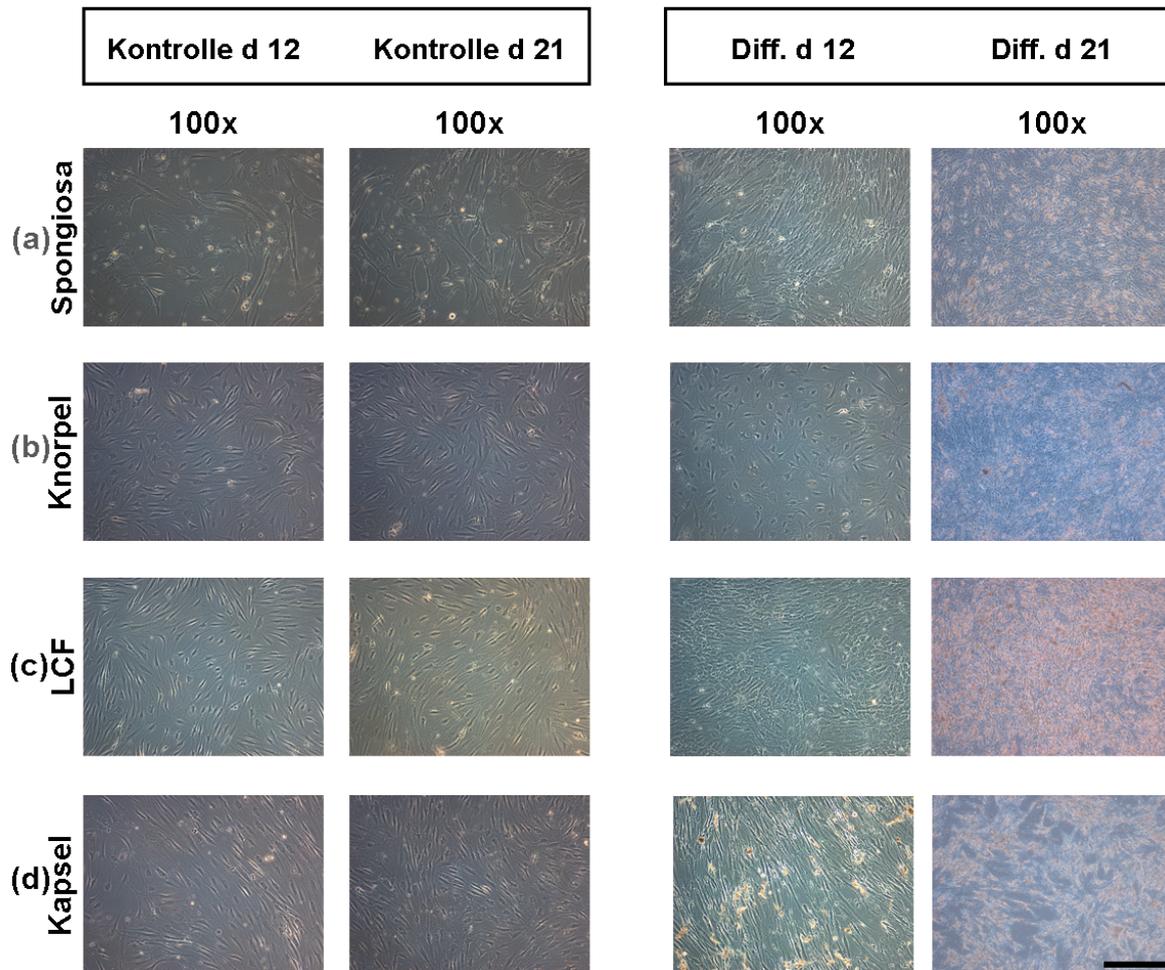
Fehlerbalken sprechen für eine weite Streuung der mittleren Genexpression innerhalb der unterschiedlichen Patientenproben (Abbildung 7).

### **3.4 Osteogene Differenzierung**

#### **3.4.1 Ausbildung mikroskopischer Unterschiede im Rahmen der osteogenen Differenzierung**

Für die osteogene Differenzierung wurden Monolayer-Kulturen der unterschiedlichen Zellen für 21 d in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert, während für den gleichen Zeitraum Negativkontrollen in osteogenem Kontrollmedium kultiviert wurden. Das Wachstum sowie das morphologische Erscheinungsbild der Zellen wurden nach 12 d und 21 d beurteilt (Abbildung 8).

## Osteogene Differenzierung



**Abbildung 8** Ungefärbte, 100-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur mikroskopischen Beurteilung der Negativkontrollen (Kontrolle) und osteogen differenzierten (Diff.) Kulturen von Zellen aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und Hüftgelenkskapsel (d) nach 21 d.

Die Zellen, sowie die dazugehörigen Negativkontrollen wurden für 21 d in Monolayer-Kulturen in dem passenden Differenzierungs- oder Kontrollmedium inkubiert. Die Differenzierung und das Wachstum der Zellen wurden nach 12 und 21 d unter dem Phasenkontrastmikroskop miteinander verglichen. Skalierungsbalken (100x): 100 µm.

Im Zeitverlauf zeigten sich in allen Negativkontrollen sowohl nach 12 als auch nach 21 d ein für native MSCs typisches spindelförmiges Erscheinungsbild (Abbildung 8, Kontrolle d 12, Kontrolle d 21). Zwischen d 12 und d 21 kam es lediglich zu einer Proliferation der MSCs (Abbildung 9, Kontrolle d 21).

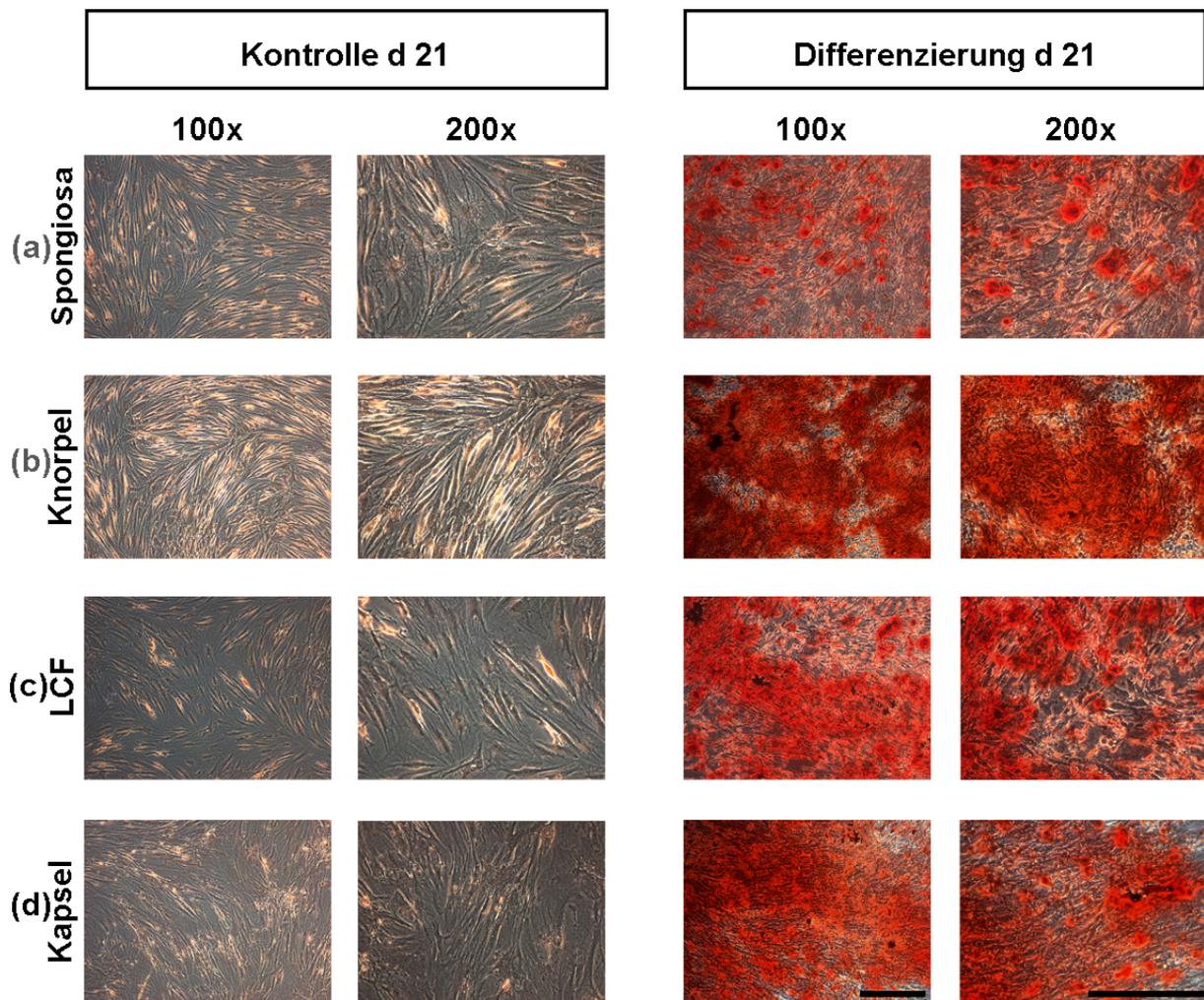
Die osteogen differenzierten Monolayer-Kulturen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel bildeten im Gegensatz dazu bis zum Ende des Differenzierungszeitraums nach 21 d am Boden der Wells dichte, spinnengewebartige und an spongiöses Knochengewebe erinnernde Strukturen (Abbildung 8, Diff. d 21). In den Aufnahmen osteogen differenzierter BM-MSCs und MSC-ähnlicher Zellen aus LCF und Hüftgelenkskapsel fanden sich bereits nach 12 d erste dichte, parazelluläre Ablagerungen innerhalb der EZM (Abbildung 8, a, c-d). Diese Ausbildung

extrazellulärer Ablagerungen setzte sich bis d 21 fort und war zum Ende des Differenzierungszeitraums nach 21 d auch in der Kultur der osteogen differenzierten MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpelgewebe sichtbar (Abbildung 9, b, Diff. d 21).

#### 3.4.2 Alizarinrot S-Färbung der Monolayer-Zellkulturen

In der Alizarinrot S-Färbung kommt es durch Komplexbildungen mit extrazellulären Calcium-Ionen zu einer roten Färbung dieser. Da Calcium-Ionen als Hydroxylapatit-Kristalle in Verbindung mit Phosphat einen großen Bestandteil der EZM des Knochengewebes bilden, ist eine positive Färbung ein Indiz für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der MSCs. Die Alizarinrot S-Färbung ermöglichte eine optische Untersuchung des osteogenen Differenzierungspotentials der vier verschiedenen MSC-Subpopulationen (Abbildung 9).

## Alizarinrot S



**Abbildung 9** Histologische Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen in 100- und 200-facher Vergrößerung zur Beurteilung der Alizarinrot S-Färbung der undifferenzierten Kulturen (Kontrolle d 21) und differenzierter Kulturen (Differenzierung d 21) von Zellen aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und der Hüftgelenkskapsel (d) nach 21 d.

Für 21 d wurden die Zellen und ihre undifferenzierten Kontrollen in den passenden Medien kultiviert. Die osteogene Differenzierung der Zellen wurde nach 21 d mithilfe der Alizarinrot S-Färbung unter dem Mikroskop miteinander verglichen. Kleiner Skalierungsbalken (100x): 100 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 20 µm.

Die undifferenzierten Negativkontrollen der Zellen zeigten nach 21 d Kultur im osteogenen Kontrollmedium keine positive Alizarinrot S-Färbungen (Abbildung 9, Kontrolle d 21). Die Zellen wuchsen in linearer Ausrichtung zueinander und bedeckten zum Ende des Differenzierungszeitraums den Boden der Wells nahezu vollständig (Abbildung 9, Kontrolle d 21).

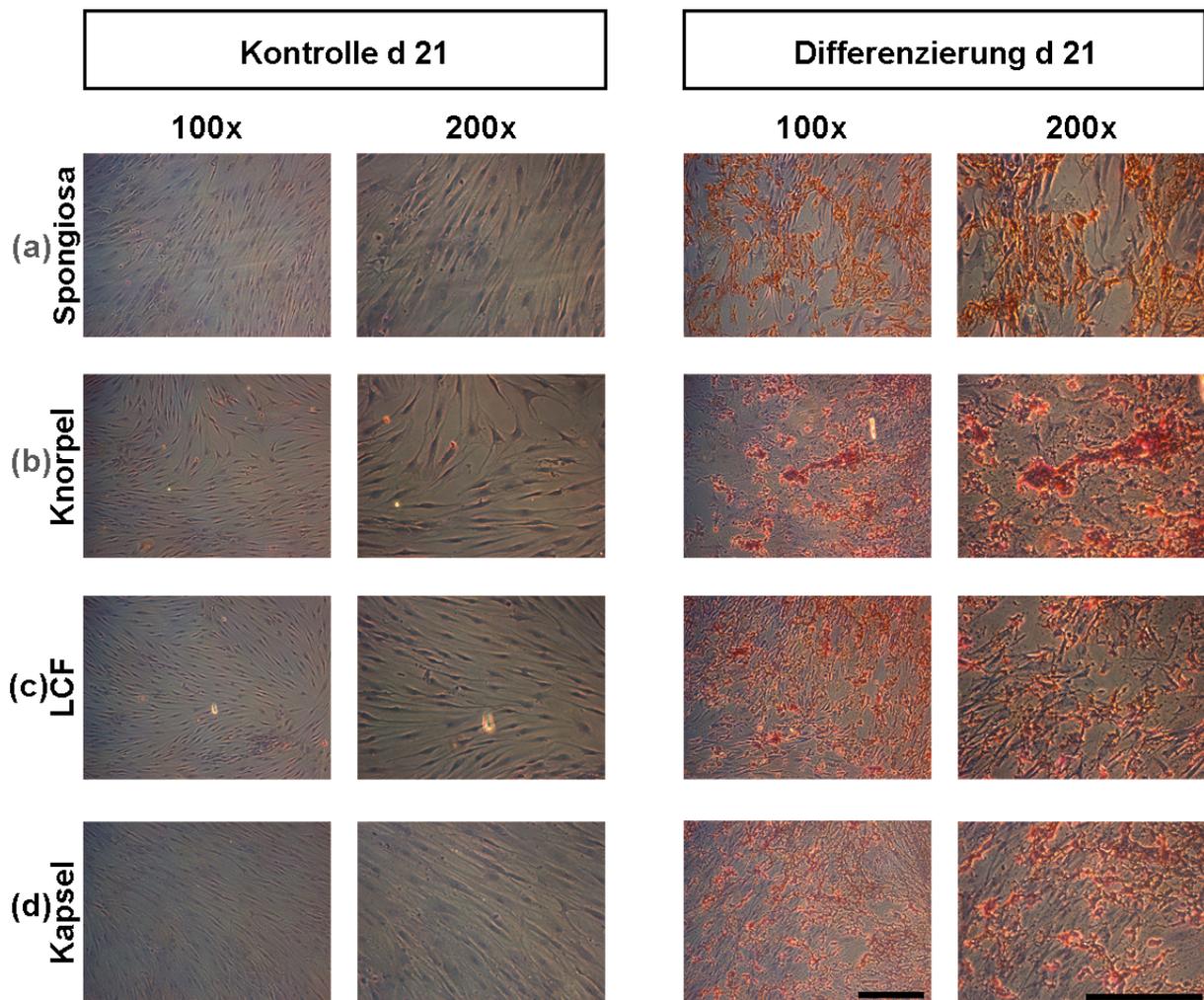
Im Kontrast dazu zeigten die im osteogenen Differenzierungsmedium kultivierten BM-MSCs und MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpel, LCF und Kapsel nach 21 d eine deutliche Rotfärbung innerhalb der Wells (Abbildung 9, Differenzierung d 21). Die in den ungefärbten Mikroskopaufnahmen hell erscheinenden, extrazellulären Ablagerungen in den differenzierten

Kulturen (Abbildung 8, Diff. d 21, a-d) wurden somit als rot gefärbte, extrazellulären Calcium-Ablagerungen identifiziert (Abbildung 9, Diff. d 21). Dabei wirkten die rot gefärbten Calcium-reichen Areale in den differenzierten Kulturen der BM-MSCs eher punktförmig angeordnet (Abbildung 9, Diff. d 21, a). Die Verteilung Alizarinrot S-positiver Bereiche in den differenzierten MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpel und Kapsel (Abbildung 9, Diff. d 21, b, d) erschien im Gegensatz dazu eher flächig bzw. diffus angeordnet.

### 3.4.3 Immunhistochemische Färbung des Markermoleküls Collagen Typ I

Das faserbildende Col I-Molekül bildet neben den Hydroxylapatit-Kristallen einen weiteren wichtigen Bestandteil der EZM des Knochengewebes. Die geflechtartige Anordnung der Collagenfibrillen ermöglicht eine Zugbelastung des ausgehärteten Gewebes in verschiedene Richtungen. Der Nachweis großer Mengen von Col I, das durch die immunhistochemische Färbung rot dargestellt wurde, dient somit als ein weiterer Indikator für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der MSC-Subpopulationen.

## Col I



**Abbildung 10** Immunhistochemische Färbung von Col I in 100- und 200-facher (b,d) Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop zur Beurteilung der osteogen differenzierten Zellen (Differenzierung d 21) aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und anteriorer Hüftgelenkskapsel (d), sowie ihrer Negativkontrollen (Kontrolle d 21) nach 21 d.

Die osteogen differenzierten Zellen, sowie ihre jeweiligen Negativkontrollen wurden für 21 d in Monolayern kultiviert. Die Osteogenese der Zellen wurde nach 21 d mithilfe der immunhistochemischen Col I-Färbung unter dem Mikroskop miteinander verglichen. Ein positiver Nachweis von Col I erscheint als rote Färbung. Kleiner Skalierungsbalken (100x): 100 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 20 µm.

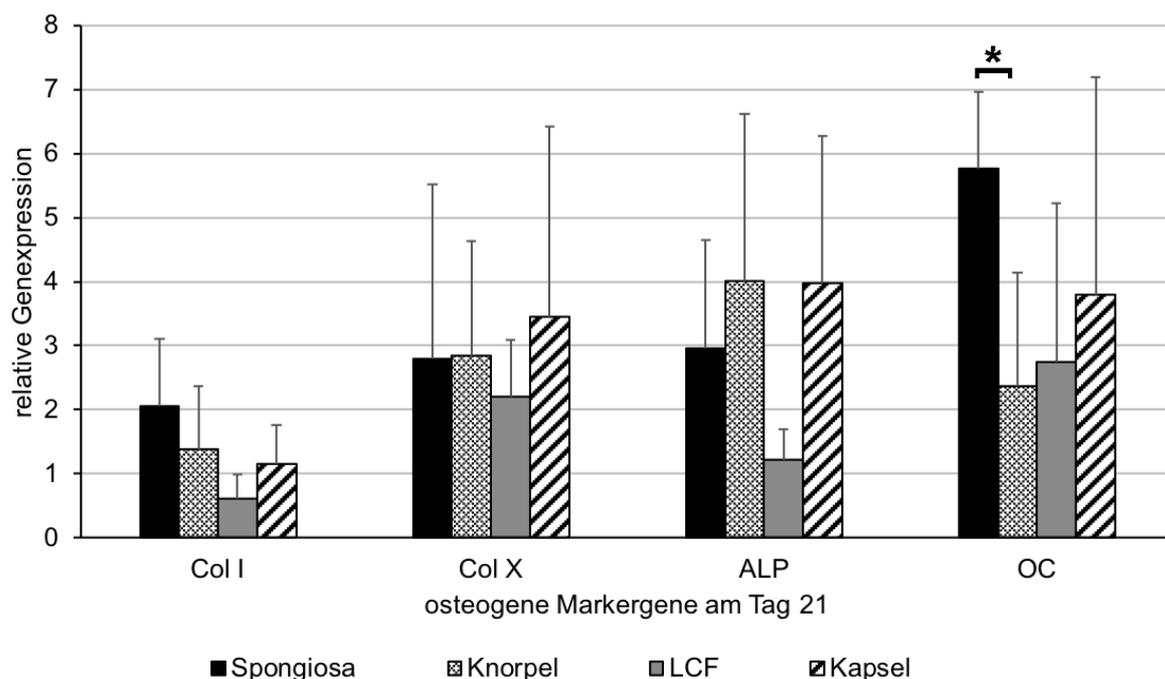
Für die Negativkontrollen der BM-MSCs und MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpel, LCF und Kapsel (Abbildung 10, Kontrolle d 21) zeigten sich nach 21 d keine Nachweise von Col I in der immunhistochemischen Färbung. Durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin kam es lediglich zu einer Blaufärbung der Zellkerne der MPCs (Abbildung 10, Kontrolle d 21).

Im Gegensatz dazu zeigten sich in allen der osteogen differenzierten Zell-Kulturen nach 21 d deutliche Nachweise rot gefärbter Col I-Moleküle (Abbildung 10, Differenzierung d 21). Die rot gefärbten Col I-Moleküle verteilten sich ausgehend von stark gefärbten Zentren geflechtartig zwischen und entlang der sichtbaren Zellen. Zwischen den vier unterschiedlichen,

differenzierten MSC-Subpopulationen zeigten sich in der Anordnung der Col I-Moleküle keine nennenswerten mikroskopischen Unterschiede (Abbildung 10, Differenzierung d 21, a-d).

### 3.4.4 Semiquantitative RT-PCR osteogener Markergene

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die molekularbiologischen Veränderungen im Rahmen der osteogenen Differenzierung visualisiert und densitometrisch ausgewertet. So konnten Veränderungen in der relativen Expression der osteogenen Markergene Col I, Col X, Alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin (OC) zwischen den differenzierten Monolayer-Kulturen und ihren Negativkontrollen dargestellt werden. Dazu wurden die Mittelwerte der Veränderung der relativen Expression der osteogenen Markergene in differenzierten MPC-Kulturen im Vergleich zu den passenden Negativkontrollen sowie die dazugehörige SD berechnet (Abbildung 11).



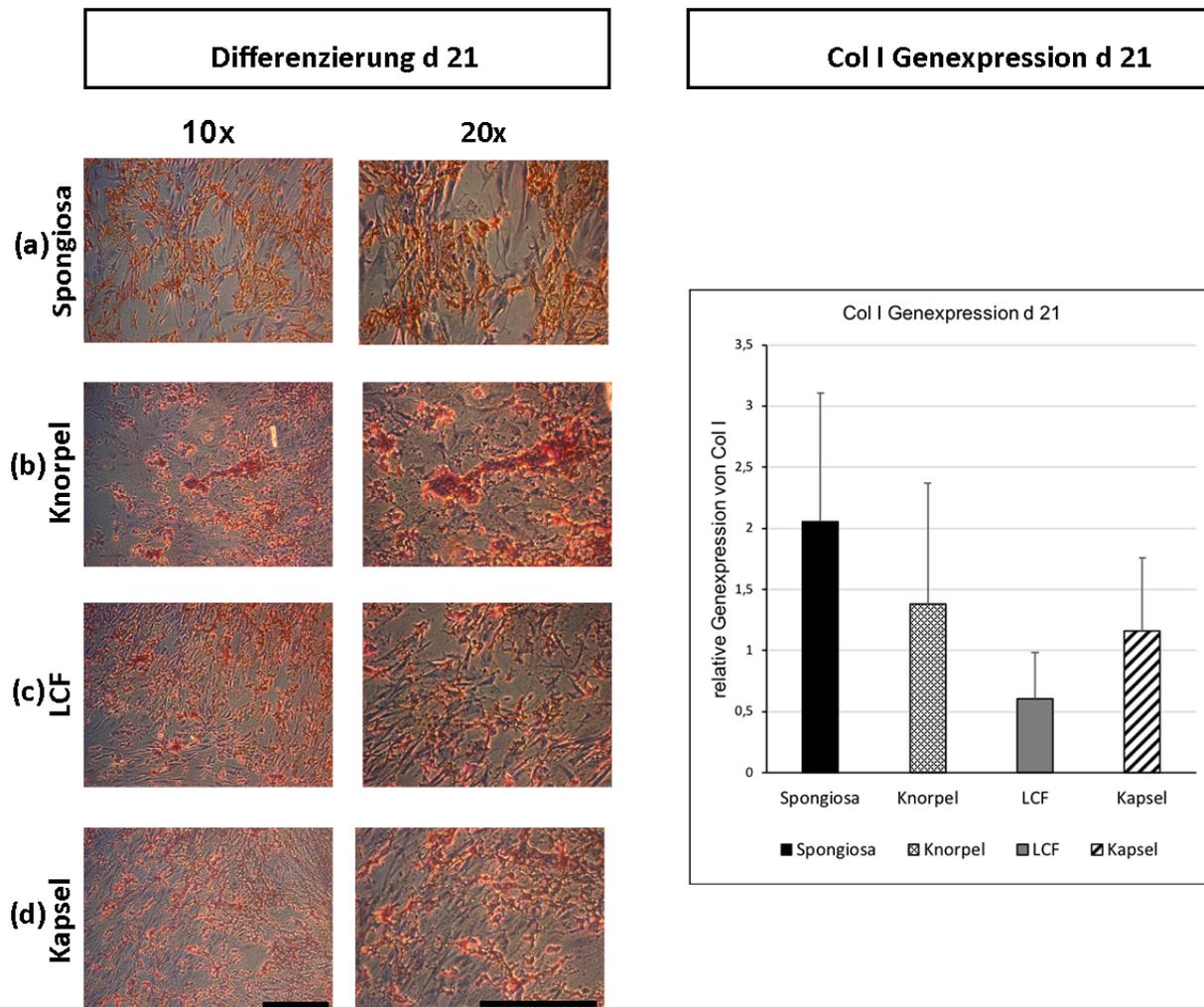
**Abbildung 11** Durch semiquantitative RT-PCR ermittelte Mittelwerte  $\pm$  SD der Veränderungen der relativen Genexpression osteogener Markergene Col I, Col X, ALP und OC in den differenzierten Kulturen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel im Vergleich zu den Negativkontrollen nach 21 d. Signifikante Unterschiede zwischen zwei MSC-Subpopulationen sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Die Monolayer-Zellkulturen aller Ursprungsgewebe wurden für 21 d in einem osteogenen Differenzierungsmedium, sowie einem passenden osteogenen Kontrollmedium kultiviert. Im Anschluss erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR die Auswertung der Expression der spezifischen osteogenen Markergene Col I, Col X, ALP und OC.

In allen differenzierten Zell-Kulturen zeigten sich für drei der vier osteogenen Markergene - Col X, ALP und OC - nach 21 d der Osteogenese eine deutlich gesteigerte mittlere Expression (Abbildung 11, Col X, ALP, OC). Auffällig hierbei war die im Vergleich zu den differenzierten MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpelgewebe signifikant stärkere Steigerung der Genexpression von OC in differenzierten BM-MSCs (Abbildung 11, OC). Weiterhin zeigte die Expression des Markergens ALP in den differenzierten Kulturen aus dem LCF gegenüber denen aus anderen Geweben einen weniger starken Anstieg der mittleren Expression (Abbildung 11, ALP).

Eine Ausnahme bildete die Änderung der mittleren Genexpression des osteogenen Markergens Col I (Abbildung 11, Col I). Nach 21 d Kultur in osteogenem Differenzierungsmedium zeigte sich zu diesem Zeitpunkt lediglich in differenzierten Kulturen der BM-MSCs ein klarer Anstieg der mittleren Genexpression von Col I (Abbildung 11, Col I). Die Expression des Gens Col I in den differenzierten MSCs aus LCF lag nach 21 d der Osteogenese im Mittel sogar etwas unterhalb der mittleren Expressionsrate der Kontrollkulturen (Abbildung 11, Col I). Diese Unregelmäßigkeiten in Bezug auf die Änderungen der Expression des osteogenen Markergens Col I (Abbildung 12, Col I Genexpression d 21) stehen im Kontrast zu der klar gesteigerten Synthese des zugehörigen osteogenen Markermoleküls Col I in allen differenzierten MSC-Kulturen (Abbildung 12, Differenzierung d 21).

## Col I



**Abbildung 12** Vergleichende Darstellung der immunhistochemischen Färbung von Col I (1-4), sowie der im Vergleich zu den Negativkontrollen relativen, mittleren Genexpression des osteogenen Markergens Col I (5) in osteogen differenzierten Zell-Kulturen aus Spongiosa (1, 5), Knorpel (2, 5), LCF (3, 5) und Gelenkkapsel (4, 5).

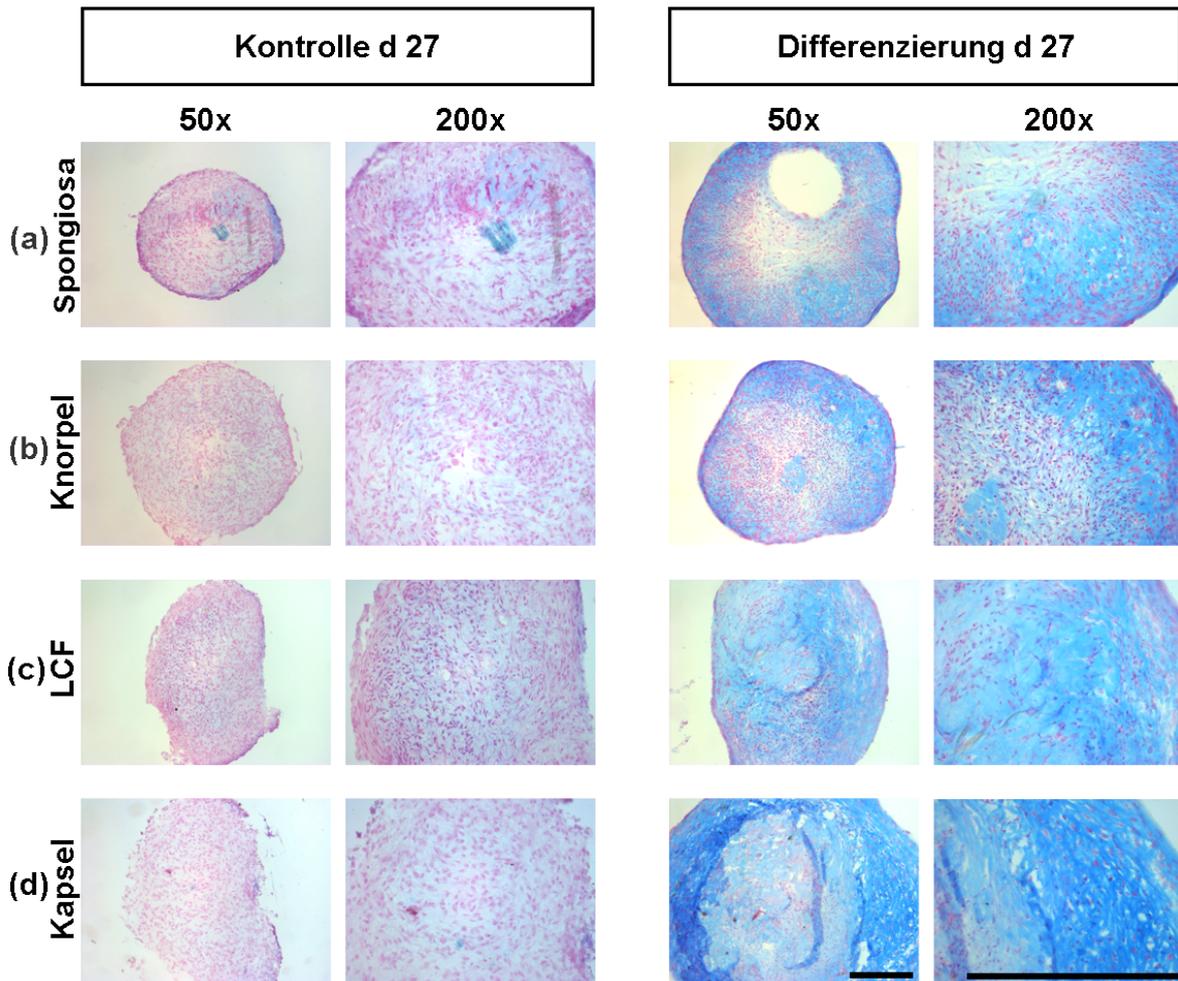
Die Zellen wurden für 21 Tage mit osteogenem Differenzierungs- und Kontrollmedium in Monolayer-Kulturen inkubiert. Im Anschluss erfolgte die immunhistochemische und molekularbiologische Auswertung. Kleiner Skalierungsbalken (100x): 100 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 20 µm.

### 3.5 Chondrogene Differenzierung

#### 3.5.1 Alcianblau-Färbung der Pellet-Zellkulturen

Durch die Alcianblau-Färbung wurden negativ geladene Proteoglykane in der EZM der Pellets blau angefärbt. Da diese langkettigen, wasserbindenden Moleküle einen großen Bestandteil der natürlichen EZM des hyalinen Knorpels bilden, liefert die Färbung einen quantitativen Überblick über den Grad der chondrogenen Differenzierung der Pellet-Kulturen nach 27 d (Abbildung 13).

## Alcianblau



**Abbildung 13** 50- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Chondrogenese mithilfe der Alcianblau-Färbung der Negativkontrollen (Kontrolle d 27) und differenzierten (Differenzierung d 27) Pellets aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und der Hüftgelenkskapsel (d).

Für die Einleitung der Chondrogenese wurden die Pellets für 27 d in dem dafür vorgesehenen Differenzierungsmedium inkubiert, während Negativkontrollen in einem Kontrollmedium inkubiert wurden. Die chondrogene Differenzierung der Zellen wurde nach 27 d mithilfe der Alcianblau-Färbung unter dem Phasenkontrastmikroskop miteinander verglichen. Kleiner Skalierungsbalken (50x): 300 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 300 µm.

Die Negativkontrollen zeigten nach 27 d der Chondrogenese durchweg negative Alcianblau-Färbungen, in denen lediglich die Kerne der dicht gepackten Zell-Pellets rot gefärbt zum Vorschein kamen (Abbildung 13, Kontrolle d 27).

Für alle chondrogen differenzierten Pellets aus den vier Ursprungsgeweben zeigte sich nach 27 d eine deutlich cyan-blaue Färbung der EZM in den Pellet-Querschnitten (Abbildung 13, Differenzierung d 27). Nach 27 d kam es somit nach Inkubation in chondrogenem Differenzierungsmedium zu einer gesteigerten Synthese von Proteoglykanen in den differenzierten Pellets (Abbildung 13, Differenzierung d 27). Zwischen den chondrogen differenzierten MSC-Subpopulationen konnten keine klaren Unterschiede hinsichtlich der

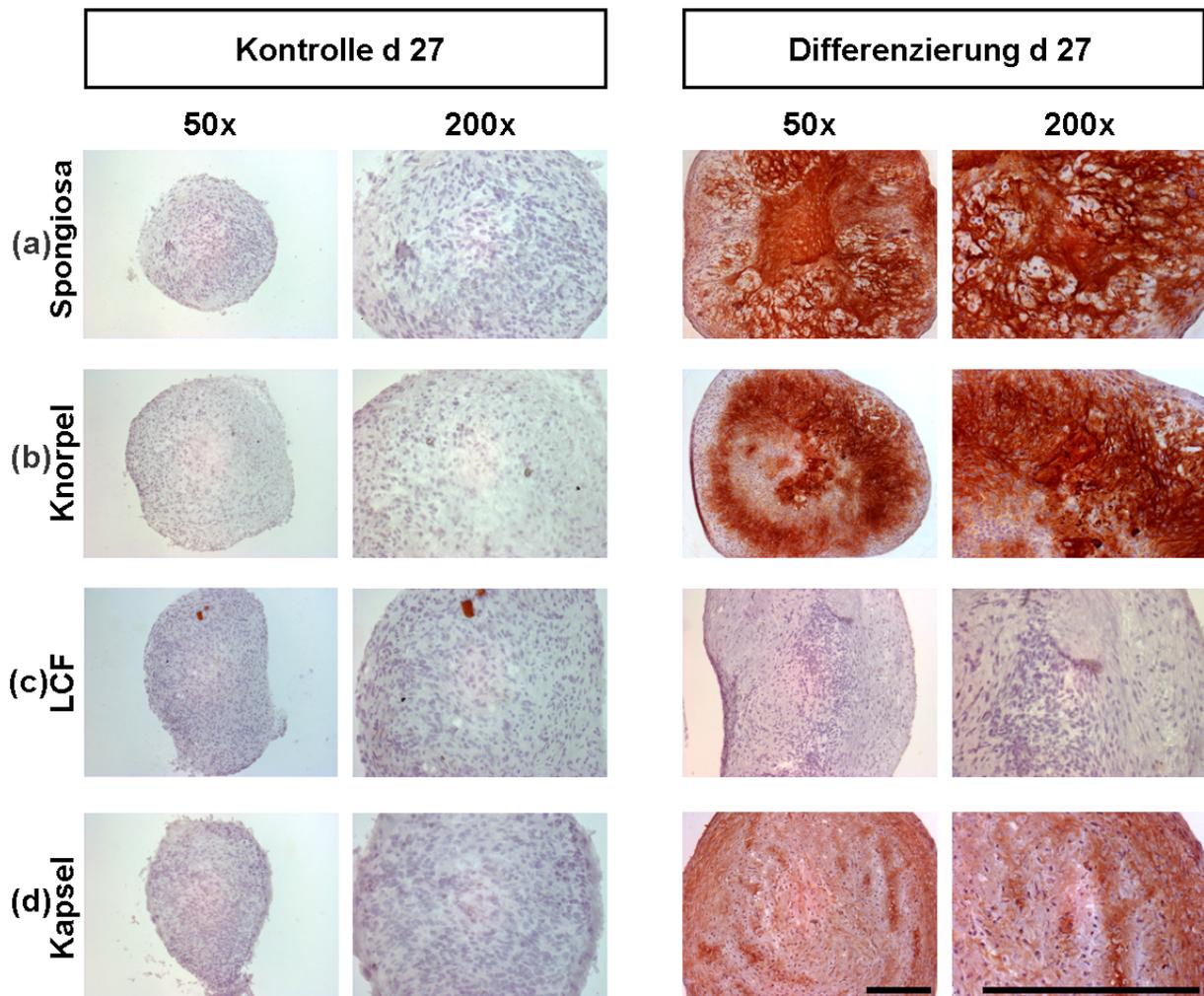
Intensität der Färbung beobachtet werden (Abbildung 13, Differenzierung d 27). Auffällig war jedoch, dass für alle der differenzierten Pellet-Kulturen die äußeren, zellarmen Bereiche der Pellets eine intensivere Färbung aufwiesen (Abbildung 13, Differenzierung d 27).

Verglich man den mikroskopischen Aufbau der Pellets sowie ihre histologische Ähnlichkeit zu hyalinem Knorpelgewebe, so zeigten sich optische Differenzen: Querschnitte der Pellets aus Spongiosa und Knorpel zeigten in den randständigen Bezirken einen chondrogenen Phänotyp mit weniger dicht angeordneten Zellkernen, die Chondronen-ähnliche Strukturen bildeten und von großen Mengen an Proteoglykanen umgeben waren (Abbildung 13, Differenzierung d 27, a-b). Die Pellets des LCF (Abbildung 13, Differenzierung d 27, c) erinnerten durch die eher strangförmig angeordneten, zellreichen Strukturen an die histologische Struktur von Faserknorpel. In den differenzierten Pellets aus dem Kapselgewebe (Abbildung 13, Differenzierung d 27, d) fanden sich zwar vereinzelt Bereiche, die phänotypische Ähnlichkeit mit hyalinem Gelenknorpel hatten, jedoch waren diese weniger stark ausgeprägt als in Pellets aus Spongiosa und Knorpel (Abbildung 13, Differenzierung d 27, a-b).

### 3.5.2 Immunhistochemische Färbung des Markermoleküls Collagen Typ II

Die EZM des hyalinen Knorpelgewebes besteht zu einem hohen Anteil aus dem Strukturprotein Col II. Der immunhistochemische Nachweis von Col II gilt daher als der Goldstandard in der Beurteilung der erfolgreichen chondrogenen Differenzierung in MSCs. Mithilfe immunhistochemischer Färbungen konnten Col II-reiche Areale der MSC-Pellets rot gefärbt dargestellt werden (Abbildung 15).

## Col II



**Abbildung 14** Immunhistochemisch gefärbte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen in 50- und 200-facher Vergrößerung zur Detektion des Matrixproteins Col II in undifferenzierten Kontrollen (Kontrolle d27) und chondrogen differenzierten Pellets (Differenzierung d 27) aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und der Hüftgelenkskapsel (d).

Die chondrogen differenzierten Pellets, sowie die Kontroll-Pellets wurden für 27 d in dem dafür passenden Differenzierungs- oder Kontrollmedium kultiviert. Nach 3 Wochen wurde die immunhistochemische Färbung von Col II in Pellet-Querschnitten unter dem Mikroskop miteinander verglichen. Ein positiver Nachweis von Col II erschien als rote Färbung. Kleiner Skalierungsbalken (50x): 300 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 300 µm.

Die Kontroll-Pellets aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel zeigten nach 27 d keine nachweisbaren Col II-Moleküle in der EZM der Pellets (Abbildung 14, Kontrolle d27).

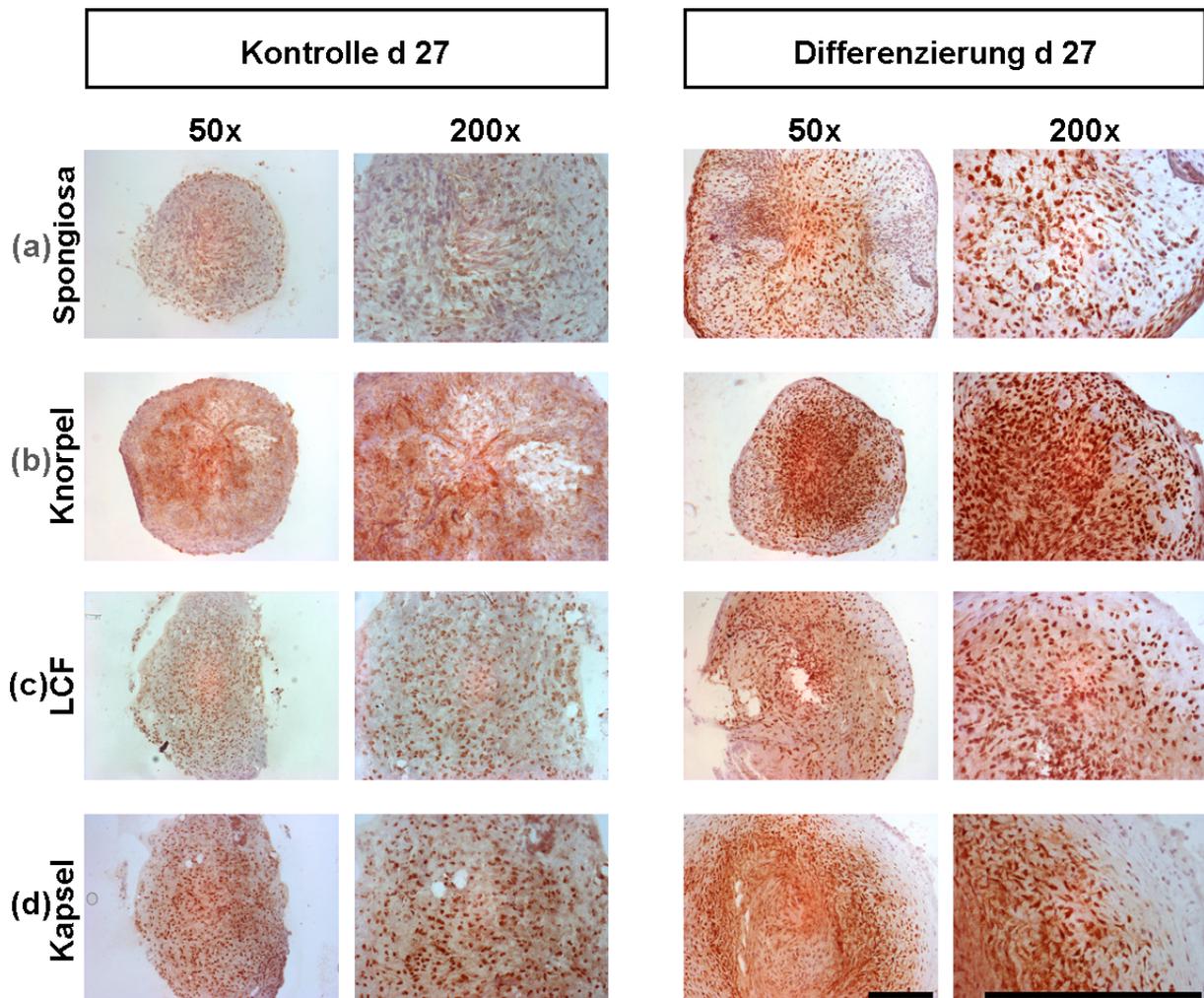
Im Gegensatz dazu zeigte sich zu diesem Zeitpunkt in den chondrogen differenzierten Zell-Pellets aus Spongiosa, Knorpel und Kapsel eine deutliche Rotfärbung der Pellet-Querschnitte (Abbildung 14, Differenzierung d 27). In den zentralen Arealen der Pellets aus Spongiosa und Knorpel (Abbildung 14, Differenzierung d 27, a-b) bildeten sich eher flächig gefärbte Areale ab. In den äußeren Bereichen der differenzierten Pellet-Querschnitte aus Spongiosa, Knorpel und Kapsel (Abbildung 14, Differenzierung d 27, a-b, d) umgab Col II geflechtartig, die in Chondronen angeordneten Zellen. Insgesamt war die Färbung der Col II-Moleküle in den

Pellets aus Kapselgewebe (Abbildung 14, Differenzierung d 24, d) von niedrigerer Intensität als die in den Pellet-Querschnitten aus Spongiosa und Knorpelgewebe (Abbildung 14, Differenzierung d 27, a-b). Interessanterweise konnten alleine in den chondrogen differenzierten Pellets aus dem LCF nach 27 d immunhistochemisch keine Col II-Moleküle nachgewiesen werden (Abbildung 14, Differenzierung d 27, d).

### 3.5.3 Immunhistochemische Färbung des hypertrophen Markermoleküls Collagen Typ X

Im Rahmen der enchondralen Ossifikation gilt das Matrixmolekül Col X als ein Marker für den Übergang der chondrogenen in die hypertrophe oder osteogene Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge. Col X wird daher auch im Rahmen der chondrogenen Differenzierung in vitro als Marker der hypertrophen Differenzierung in MSCs verwendet. Durch die immunhistochemische Färbung der MPC-Pellets konnte Col X rot-braun dargestellt werden (Abbildung 15).

## Col X



**Abbildung 15** 50 und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop Aufnahmen zur Beurteilung der immunhistochemischen Col X-Färbung in Negativkontrollen (Kontrolle d 27) und chondrogen differenzierten MSC-Pellets (Differenzierung d 27) aus Spongiosa (a), Knorpelgewebe (b), dem LCF (c) und der anterioren Gelenkkapsel (d) des Hüftgelenks.

Für 27 d wurden die Pellets jeweils in chondrogenem Differenzierungs- oder Kontrollmedium inkubiert. Die immunhistochemische Färbung von Col X wurde nach 27 d der Chondrogenese unter dem Mikroskop miteinander verglichen. Ein positiver Nachweis von Col X erschien als rot-braune Färbung. Kleiner Skalierungsbalken (50x): 300 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 300 µm.

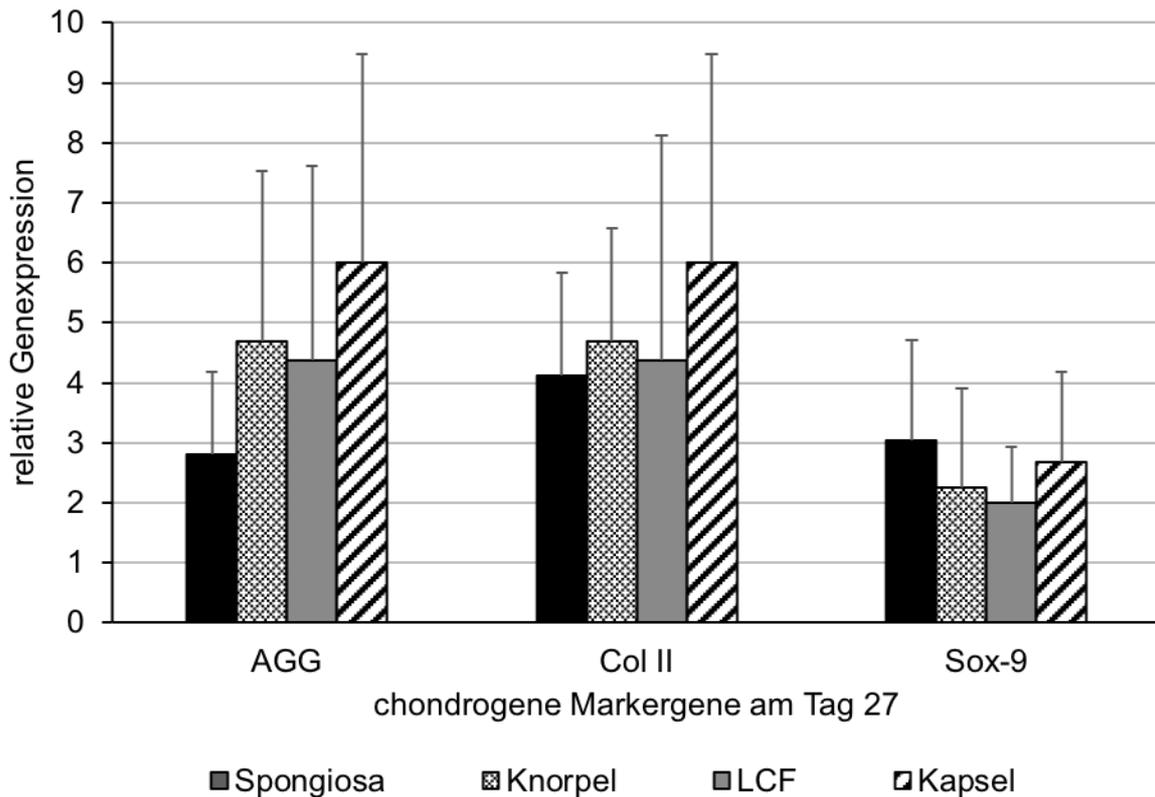
Nach 27 d zeigten die Negativkontrollen einen leichten positiven Nachweis des Moleküls Col X in den zentral gelegenen Anteilen der Pellet-Querschnitte (Abbildung 15, Kontrolle d 27).

In den differenzierten Kulturen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel zeigten sich ebenfalls Col X-positive Bereiche der abgebildeten Pellet-Querschnitte (Abbildung 15, Differenzierung d 27). Die äußeren Zonen der Pellets, die eine klar positive Col II Färbung gezeigt hatten (Abbildung 14, Differenzierung d 27, a-b, d), erschienen weniger intensiv gefärbt. Lediglich in den zentralen Bereichen der Pellets zeigten sich in direkter Umgebung zu den Zellkernen klar gefärbte Areale (Abbildung 15, Differenzierung d 27). Vergleich man die jeweiligen Negativkontrollen (Abbildung 15, Kontrolle d 27) mit den chondrogen differenzierten Pellets

(Abbildung 15, Differenzierung d 27), so erschienen die differenzierten Pellets lediglich etwas stärker gefärbt. Somit kam es in der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen unabhängig von der Inkubation in chondrogenem Differenzierungsmedium oder Kontrollmedium lediglich zu einer unwesentlich gesteigerten Produktion von Col X innerhalb der Pellet-Querschnitte.

#### 3.5.4 Semiquantitative RT-PCR chondrogener Markergene

Mithilfe der RT-PCR wurden molekularbiologischen Veränderungen im Zuge der Chondrogenese verstärkt und später mittels Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Durch eine densitometrische Auswertung der Gel-Banden konnte eine Steigerung in der relativen Genexpression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und Sox-9 in differenzierten Pellet-Kulturen, verglichen mit ihren Negativkontrollen, quantifiziert werden. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Veränderung der relativen Genexpression, sowie die dazugehörige SD in Form von Fehlerbalken (Abbildung 16).



**Abbildung 16** Mittelwerte  $\pm$  SD (Fehlerbalken) der durch semiquantitative RT-PCR ermittelten Veränderungen der relativen Genexpression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und Sox-9 in differenzierten Pellet-Kulturen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel in Relation zu den jeweiligen Negativkontrollen.

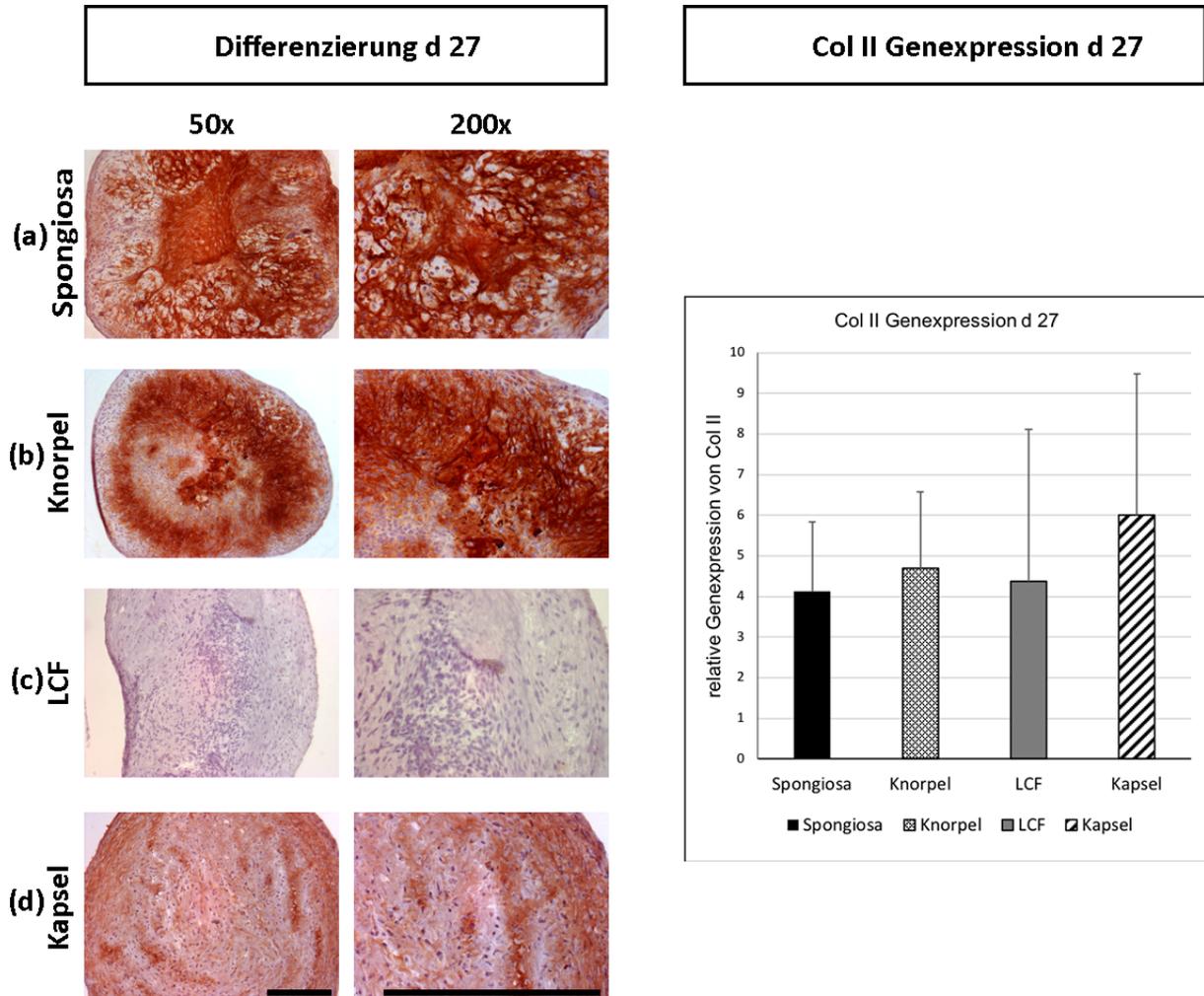
Die chondrogene Differenzierung erfolgte für 27 d durch eine Inkubation der MPC-Pelletkulturen in chondrogenem Differenzierungs- oder Kontrollmedium. Zum Ende des Differenzierungszeitraums wurden die Pellets geerntet und es erfolgte eine molekularbiologische Analyse der Expression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und Sox-9 in differenzierten und undifferenzierten Pellet-Kulturen.

im Rahmen der Chondrogenese zeigten alle der differenzierten MSC-Subpopulationen, unabhängig vom verwendeten Ursprungsgewebe, eine klare Steigerung der relativen Genexpression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und Sox-9 (Abbildung 16). Auffallend stark war die mittlere Steigerung der relativen Genexpression von AGG und Col II in den differenzierten Pellets aus dem Kapselgewebe (Abbildung 16, AGG, Col II). Im Kontrast dazu war die Steigerung der Expression des chondrogenen Markergens AGG in den differenzierten Pellets aus BM-MSCs schwächer als in denen anderer Gewebe (Abbildung 16, AGG).

Interessanterweise zeigte sich auch in den chondrogen differenzierten Pellets aus dem LCF eine klar gesteigerte relative Genexpression des Markergens Col II (Abbildung 17, Col II Genexpression d 27, LCF), obwohl der immunhistochemische Nachweis von Col II negativ ausfiel (Abbildung 17, Differenzierung d 27, c). Keine der beschriebenen Unterschiede in Bezug auf die Genexpression der Markergene AGG, Col II oder Sox-9 zwischen den vier verschiedenen Subpopulationen von MSCs war dabei von statistischer Signifikanz. Die

Fehlerbalken deuten auf eine breite Streuung der Genexpression chondrogener Markergene innerhalb der unterschiedlichen Patientenproben hin (Abbildung 16).

## Col II



**Abbildung 17** Vergleich der immunhistochemischen Färbungen des Matrixmoleküls Col II (1-4), sowie der mittleren relativen Genexpression von Col II (5) in den chondrogen differenzierten Pellets aus Spongiosa (1, 5), Knorpel (2, 5), LCF (3, 5) und Gelenkkapsel (4, 5) im Vergleich zu den Negativkontrollen.

Die Pellets wurden für 27 d in chondrogenem Differenzierungs- und Kontrollmedium inkubiert. Im Anschluss erfolgte die immunhistochemische und molekularbiologische Auswertung der Synthese und Expression des chondrogenen Markermoleküls Col II. Kleiner Skalierungsbalken (50x): 300 µm. Großer Skalierungsbalken (200x): 300 µm.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Diskussion der verwendeten Materialien und Methoden

#### 4.1.1 TGF- $\beta$ 1 im Vergleich mit anderen chondrogenen Wachstumsfaktoren

Ein Grundproblem bei der Behandlung hyaliner Gelenkknorpeldefekte bleibt die Erzeugung eines langfristig stabilen, hyalin-artigen Knorpelregenerates. MSCs bieten einen vielversprechenden Ansatz in der regenerativen Therapie fokaler Knorpeldefekte. Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung verschiedener Subpopulationen von MSCs aus verschiedenen Geweben des arthrotischen Hüftgelenks. Eine Vielzahl von Forschungsarbeiten widmete sich bereits der Optimierung der sogenannten Triade des TE, die sich aus einer Kombination von Zellen, Wachstumsfaktoren und Zellträgern zusammensetzt. So sollen unter anderem Lösungen für die Herausforderungen der chondrogenen Differenzierung, der hypertrophen De-Differenzierung, sowie der minimalinvasiven Isolation von MSCs gefunden werden. Diese Arbeit liefert durch die Untersuchung des LCF und der anterioren Gelenkkapsel, die im Rahmen der Implantation einer Hüft-TEP über den anterioren Zugang routinemäßig entnommen werden, einen Überblick über neue MSC-Subpopulationen, die zukünftig in zellbasierten Verfahren der Knorpelregeneration eingesetzt werden können.

Eine Vielzahl an Kombinationen von Wachstumsfaktoren wurden bereits im Hinblick auf ihr Potential zur chondrogenen Differenzierung von MSCs in vitro untersucht [37, 166-168]. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die TGF- $\beta$ -Superfamilie [169]. Die Protein Isoformen TGF- $\beta$ 1-3 [65, 148, 170], sowie BMP-2 [171], -6 und -7 [37, 168, 172] zählen zu ihren bekanntesten Mitgliedern und bilden die Basis unterschiedlicher chondrogener Differenzierungsmedien in vitro [37, 166]. Auch IGF-1 induziert, insbesondere in Kombination mit Proteinen der TGF- $\beta$ -Superfamilie, die Ausbildung knorpeltypischer Merkmale in MSCs: So verstärkte IGF-1 die durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Chondrogenese [64, 156]. Fibroblast growth factor (FGF-2) führte in MSCs zu einer vermehrten Produktion knorpelspezifischer Matrixproteine und einer damit verbundenen Verbesserung der chondrogenen Differenzierung [173, 174]. Anders als die bisher genannten Wachstumsfaktoren induziert Dexamethason nicht spezifisch die chondrogene Differenzierung, in Kombination mit den TGF- $\beta$ 1-3 Isoformen zeigte sich jedoch eine Zunahme der Pelletgröße und eine gesteigerte Produktion von AGG, Proteoglykanen und Col II [106, 130, 175].

Die Mediatoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie spielen also eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung hyalinen Knorpels in vitro, jedoch ist für die Optimierung der Chondrogenese von MSCs ihr synergistisches Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren und Glucocorticoiden entscheidend [176]. Nach Puetzer et al. beinhaltet ein optimales

chondrogenes Differenzierungsmedium TGF- $\beta$ 3, Dexamethason und BMP-6, wobei die Notwendigkeit des Wachstumsfaktors BMP-6 nicht sicher belegt ist [168, 177]. Obwohl TGF- $\beta$ 3 in vitro eine starke chondrogene Differenzierung in MSCs induziert, eignet sich auch die Isoform des Proteins TGF- $\beta$ 1 zur Einleitung der Chondrogenese, wenn auch diese schwächer ausfällt [166, 168, 178, 179].

Neben den Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie spielt vor allem Sox-9 eine entscheidende Rolle im Zuge der chondrogenen Differenzierung von MSCs [180]. So führte der gezielte, adenovirale Gen-Transfer von Sox-9 in BM-MSCs zu einer ausbleibenden hypertrophen Differenzierung und Expression osteogener Markergene im Vergleich zu BM-MSCs, die mit TGF- $\beta$ 1 oder BMP-2 transduziert wurden [155]. Gleichzeitig führte eine Suppression des Sox-9 Gens zu einer fehlenden chondrogenen Differenzierung in MSCs, die in Hydrogelen kultiviert wurden [181]. Die in dieser Arbeit verwendete Kombination von TGF- $\beta$ 1 mit einigen weiteren Mediumzusätzen als chondrogenes Differenzierungsmedium diente somit als geeigneter Initiator der Chondrogenese in MSCs in vitro. Obwohl dadurch ein erster Nachweis der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit in den isolierten Zellen erfolgen konnte, zeigten ältere Untersuchungen, dass für die Optimierung der chondrogenen Differenzierung unterschiedlicher MSC-Subpopulationen in vitro und in vivo verschiedene Kombinationen von Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren getestet werden müssen [70].

#### 4.1.2 Pellet-Kulturen im Vergleich zu anderen dreidimensionalen Kulturverfahren

Um hyalinen Knorpel in vitro nachzubilden, sind externe Stimuli zur Simulation der Kondensation von MSCs im Rahmen der embryonalen enchondralen Ossifikation im Bereich der Wachstumsfuge wichtig [106, 168, 182]. So stimulieren physiologischer hydrostatischer Druck, Scher- und dynamisch applizierte Kompressionskräfte die Bildung knorpelspezifischer Extrazellulärmatrix in MSCs [183-185]. Dreidimensionale Kultursysteme sind daher eine der Voraussetzungen für eine chondrogene Differenzierung von MSCs in vitro und zweidimensionalen Kulturformen deutlich überlegen [106, 186, 187]. Einfach modellierbare Pellet-Kulturen erzeugen ein dichtes Zell-Aggregat, das die Ausbildung von interzellulären Kontakten und Interaktionen fördert, die wiederum eine chondrogene Differenzierung der Zellen stimulieren [158, 188]. Nachteile der Pellet-Kultur sind die kleine Größe der Pellets, die ungleichmäßige Differenzierung der enthaltenen MSCs mit der möglichen Ausbildung von nekrotischen Anteilen innerhalb des Zell-Aggregats, sowie die Induktion einer hypertrophen De-Differenzierung durch die starken Zell-Zell-Interaktionen [188].

Neben der Pellet-Kultur werden im TE weitere Matrix-basierte Trägermaterialien zur Induktion der Chondrogenese in multipotenten Zellen verwendet [189, 190]. Diese sog. Scaffolds

simulieren dabei den Aufbau der EZM des hyalinen Knorpels in vivo und induzieren dadurch die Zell-Migration und -Interaktion sowie die Differenzierung der MSCs in vitro und in vivo [187]. Scaffolds aus Polymeren, wie die natürlichen, zellumkapselnden Hydrogele aus Alginat, Agarose oder Collagen, wirken pro-chondrogen und sind in ihrer Form variabel anpassbar [187, 191-193]. Synthetische Hydrogele gestalten sich vor allem durch die mögliche Manipulation ihrer mechanischen Beschaffenheit als eine interessante Alternative zu den bisher bekannten Trägermaterialien für MSCs in vivo [166, 194].

Obwohl diese Trägermaterialien einen großen Fortschritt für den Einsatz von MSCs in der Knorpelregeneration in vivo darstellen, sind sie für die Beurteilung der Chondrogenese in vitro nicht immer geeignet. Nachteile sind die hohen Produktionskosten, sowie ihre vielfältige und komplexe Zusammensetzung, die eine weitere Variable in der Beurteilung der chondrogenen Differenzierung von MSCs in vitro mit sich bringt [158]. Für die in vitro Untersuchung und den Vergleich des chondrogenen Differenzierungspotentials verschiedener MSC-Subpopulationen ist das Pelletkultursystem ausreichend geeignet und liefert aufgrund der fehlenden Variabilität durch zusätzliche Fremdmaterialien sogar einen Vorteil für unsere Arbeit.

#### 4.1.3 Zellkulturen mithilfe von Wachstumsfaktoren versus Gentherapie

Wachstumsfaktoren sind entscheidend an der Induktion multipotenter Differenzierungswege in MSCs beteiligt und können dem Differenzierungsmedium in vitro problemlos beigefügt werden. In vivo gestaltet sich die invasive Applikation der Wachstumsfaktoren in situ weitaus schwieriger. Zusätzlich ist der Erhalt einer konstanten Konzentration an Wachstumsfaktoren in situ durch ihre meist kurze Halbwertszeit problematisch. Genetisch modifizierte Zellen könnten dieses Problem durch die selbstständige, lokale Sekretion der benötigten Wachstumsfaktoren am Ort des Knorpeldefekts lösen [26, 195, 196].

Eine Vielzahl von Genen, die entscheidenden Anteil an der chondrogenen Differenzierung von Stammzellen besitzen, können bspw. über Adenoviren, Retroviren oder Lentiviren gezielt in MSCs transferiert werden. Diese befähigen MSCs zur parakrinen Sekretion pro-chondrogener Wachstums- und Transkriptionsfaktoren, welche ihre chondrogene Differenzierung positiv beeinflussen können [160, 165]. Dasselbe gilt auch für den nicht-viralen Transport von DNA über verschiedene Trägermoleküle, wobei diese anders als virale Vektoren nicht die Risiken vermehrungsfähiger, pathogener Viren bergen und deutlich weniger immunogen wirken [196]. Frühere Arbeiten zeigten allerdings auch, dass die intraartikuläre Injektion von Adenoviren, beladen mit verschiedenen Genen der TGF- $\beta$ -Superfamilie, zu unerwünschten Fibrosen, Muskelödemen, osteophytären Gelenkanbauten oder ektop gebildetem Knorpel und Knochen führen könnte [196-198].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Induktion der chondrogenen Differenzierung in MSCs via viralem oder nicht-viralem Gentransfer einen möglichen Fortschritt in der zellbasierten Knorpelregeneration in vivo darstellt. So zeigten neuere Studien, dass der adenovirale Gentransfer von Sox-9 in BM-MSCs die hypertrophe Differenzierung im Rahmen der Chondrogenese im Vergleich zur Transduktion mit TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 signifikant mindert [155]. Zusätzlich könnte der gemeinsame Gen-Transfer gezielt ausgewählter chondrogener Wachstums- und Transkriptionsfaktoren einen additiven Effekt auf die chondrogene Differenzierung der MSCs haben [199]. Für diese Arbeit, in der lediglich das multipotente Differenzierungspotential verschiedener MSC-Subpopulationen untersucht und verglichen werden sollte, ist die Differenzierung der Zellen durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren in vitro ideal geeignet.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse der einzelnen Differenzierungswege und Expression von Oberflächenantigenen**

### 4.2.1 Adipogene Differenzierung der MSCs

Die adipogene Differenzierung der isolierten BM-MSCs und MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpel, LCF und dem Kapselgewebe, die für 21 d in Monolayer-Kulturen erfolgte, verlief in allen Kulturen erfolgreich. Dies zeigte sich durch die positiven Oil Red O-Färbungen (Abbildung 6) und die gesteigerte relative Expression der adipogenen Markergene LPL und PPAR $\gamma$  (Abbildung 7) in den differenzierten Kulturen. Zwischen 12 und 21 d kam es in allen differenzierten Kulturen zu einer Zunahme mikroskopisch darstellbarer, intrazellulärer Vakuolen, die sich in der Oil Red O-Färbung als Lipidtröpfchen darstellten.

Die molekularbiologischen Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR stimmen mit den Veränderungen auf histologischer Ebene überein. Die Expression der Markergene der Adipogenese LPL und PPAR $\gamma$  war in allen differenzierten Kulturen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich gesteigert (Abbildung 7). Die Expression des Gens LPL in differenzierten Zellen aus dem LCF (Abbildung 7, LCF) und die Expression des Gens PPAR $\gamma$  in differenzierten Zellen aus dem Kapselgewebe (Abbildung 7, PPAR $\gamma$ ) fiel verglichen mit denen der anderen Gewebe weniger stark aus. Die innerhalb der einzelnen Gewebe detektierten Unterschiede im Hinblick auf die molekularbiologische Untersuchung der Adipogenese zeigten jedoch keine statistische Signifikanz, weshalb keine überlegene Quelle zur Isolation von MSCs zur adipogenen Differenzierung beschrieben werden konnte.

#### 4.2.2 Osteogene Differenzierung der MSCs

Aus allen vier verwendeten Geweben - Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel - konnten plastik-adhärenz wachsende Vorläuferzellen isoliert werden, die nach 21 d in Monolayer-Kulturen durch Zugabe eines Differenzierungsmediums erfolgreich osteogen differenziert werden konnten. Der Nachweis der Osteogenese erfolgte in differenzierten Kulturen durch eine positive Alizarinrot S-Färbung (Abbildung 9), dem immunhistochemischen Nachweis von Col I (Abbildung 10), sowie einer gesteigerten relativen Expression der osteogenen Markergene Col I, Col X, ALP und OC (Abbildung 11).

Hyperdense Ablagerungen (Abbildung 8), die mittels der Alizarinrot S-Färbung als rot gefärbt Calcium-Ablagerungen identifiziert werden konnten (Abbildung 9), deuteten gemeinsam mit den immunhistochemisch nachgewiesenen Col I-Molekülen (Abbildung 10) auf eine für Knochengewebe typische Zusammensetzung der EZM in differenzierten Kulturen hin. In Kohärenz zu den histologischen und immunhistochemischen Ergebnissen zeigte sich in allen differenzierten Kulturen eine gesteigerte Expression der genannten osteogenen Markergene (Abbildung 11). Eine Ausnahme bildete die Expression des osteogenen Matrixproteins Col I: Im Vergleich zu den klar positiven immunhistochemischen Färbungen in allen differenzierten Kulturen, zeigten in der semiquantitativen RT-PCR lediglich die differenzierten BM-MSCs eine klare Steigerung der Expression des Col I-Gens (Abbildung 12). Diese Unterschiede in der Expression des Markergens Col I und dem immunhistochemischen Nachweis des dazugehörigen Moleküls könnten womöglich auf eine phasenweise Regulation des Gens Col I im Verlauf der osteogenen Differenzierung zurückzuführen sein. Zusätzlich zeigten BM-MSCs im Vergleich zu den differenzierten Zellen aus Knorpelgewebe im Mittel eine signifikant stärkere Expression des Markergens OC (Abbildung 11, OC). Die übrigen Unterschiede in der mittleren relativen Genexpression der osteogenen Markergene waren nicht von statistischer Relevanz, so dass auch für die osteogene Differenzierung keine überlegene oder unterlegene Quelle zur Isolation von MSCs identifiziert werden konnte.

#### 4.2.3 Chondrogene Differenzierung der MSCs

Die Differenzierung der BM-MSCs und MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpel, LCF und Kapsel des Hüftgelenks zu hyalinem Knorpel stellte den entscheidenden Differenzierungsweg zur Beurteilung ihres möglichen Einsatzes im Feld der Knorpelregeneration dar. Dafür wurden differenzierte Pellets nach 27 d in chondrogenem Differenzierungsmedium auf die Ausbildung chondrogener Merkmale untersucht.

Durch die Alcianblau-Färbung (Abbildung 13) konnte in allen differenzierten Pellet-Kulturen nach 27 d eine gesteigerte Synthese von Proteoglykanen nachgewiesen werden. Diese gelten

als maßgeblicher Bestandteil der EZM des hyalinen Gelenkknorpels. Phänotypisch zeigten vor allem die Pellets aus Spongiosa und Knorpel einen morphologischen Aufbau, der mit Chondronen und zellarmen Arealen an hyalinen Gelenkknorpel erinnerte (Abbildung 13, a-b). Während diese Strukturen auch in schwächerer Ausprägung in den äußeren Bereichen der Pellets aus Kapselgewebe sichtbar waren (Abbildung 13, d), enthielten die MSC-Pellets aus LCF (Abbildung 13, c) nach 27 d der chondrogenen Differenzierung überwiegend zellreiches und faserartig erscheinendes Gewebe.

Dieses Bild bestätigte sich durch die immunhistochemische Färbung des für hyalinen Knorpel spezifischen Col II-Moleküls: Die äußeren Bereiche der MSC-Pellets aus Spongiosa, Knorpel und Kapsel, die in der Alcianblau-Färbung einen typisch chondrogenen Phänotyp zeigten, enthielten auch große Ansammlungen von Col II. Einzig in den MSC-Pellets aus LCF kam es nach dem Ablauf der chondrogenen Differenzierung zu keinem immunhistochemischen Nachweis von Col II (Abbildung 14).

Diese histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse standen nur zum Teil im Einklang mit den Auswertungen der semiquantitativen RT-PCR. Hier kam es in allen differenzierten Pellets zu einer klar gesteigerten Expression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und Sox-9 (Abbildung 16). Interessanterweise zeigten sich innerhalb der einzelnen Ursprungsgewebe keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Expression chondrogener Markergene. Somit konnte in den differenzierten Pellets aus LCF zwar immunhistochemisch kein Col II nachgewiesen werden, die Expression des entsprechenden Col II-Gens zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollkulturen jedoch deutlich gesteigert.

Insgesamt zeigten differenzierte Pellets aus Spongiosa, Knorpel und Kapsel nach 27 d auf histologischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Ebene klare Anzeichen der erfolgreichen chondrogenen Differenzierung. In chondrogen differenzierten MSC-Pellets aus LCF konnte immunhistochemisch kein Col II nachgewiesen werden, was trotz der gesteigerten Expression chondrogener Markergene in diesen Pellets auf eine unvollständige chondrogene Differenzierung schließen ließ.

#### 4.2.4 Hypertrophe Differenzierung der MSCs während der Chondrogenese

Neben der Chondrogenese wurde zum Ende der chondrogenen Differenzierung nach 27 d auch die hypertrophe De-Differenzierung der Zellen anhand des immunhistochemischen Nachweises von Col X (Abbildung 15) untersucht. In Negativkontrollen konnten nach 27 d in einem Kontrollmedium kleine Mengen von Col X-Molekülen nachgewiesen werden. In der immunhistochemischen Färbung der differenzierten Pellets zeigte sich nach 27 d lediglich eine geringfügige Zunahme der detektierbaren Col X-Moleküle nach Inkubation der Zellen in einem auf TGF- $\beta$ 1 basierenden chondrogenen Differenzierungsmedium. Wie auch in den

Negativkontrollen fanden sich die Col X-Moleküle in den zentralen Bereichen der Pellets. Die äußeren Areale der differenzierten Pellets, die in vorherigen Färbungen die größten Mengen an Proteoglykanen (Abbildung 13) und Col II (Abbildung 14) zeigten, brachten nahezu keinen Nachweis von Col X. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es innerhalb der Pellets zu einer ungleichmäßigen Differenzierung der Zellen kam, bei der zentrale Zellen in ein Stadium der hypertrophen Differenzierung übergingen, während die außen gelegenen Zellen eher Merkmale des hyalinen Gelenknorpels aufwiesen.

Die Expression der hypertrophen und osteogenen Markergene Col X und OC wurde nach 27 d zwischen differenzierten MSC-Pellets und Negativkontrollen miteinander verglichen. Obwohl für einige wenige der Negativkontrollen und differenzierten MSC-Pellets Banden für PCR-Produkte auf den Agarose-Gelen nachgewiesen wurden, konnten für die meisten der Proben selbst bei sehr hoher Zyklenzahl keine Produkte in der semiquantitativen RT-PCR detektiert werden. Da das Haushaltsgen Elongation factor 1 $\alpha$  (EEF1 $\alpha$ ) in diesen MSC-Pellets bei niedriger Zyklenzahl für alle Proben klar dargestellt werden konnte, lässt dieser Umstand auf eine sehr geringe Expression hypertropher und osteogener Markergene in chondrogen differenzierten MSC-Pellets und ihren Negativkontrollen schließen.

#### 4.2.5 Expression charakteristischer MSC-Oberflächenmarker

Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel eines exemplarisch dargestellten Spenders waren zu  $\geq 95\%$  positiv für die Oberflächenantigene CD44, CD90 und CD105. Der Großteil der Zellen war auch positiv für den Oberflächenmarker CD73, der prozentuale Anteil der positiven Zellen lag jedoch unter 95%. Auffällig war, dass alle der isolierten Zellpopulationen eine gleichmäßig niedrigere Expression des CD73-Antigens zeigten. Somit scheint die verhältnismäßig niedrige Expression von CD73 nicht durch die Wahl des Nativgewebes der isolierten Zellen beeinflusst zu werden. Durch die Auswahl eines anderen Antikörper-Konjugats hätte der von der ISCT vorgegebene, untere Schwellenwert für die Expression von CD73 also womöglich trotzdem erreicht werden können. Obwohl die Expression hämatopoetischer Oberflächenantigene, wie in den Kriterien der ISCT gefordert, nicht untersucht wurde, zeigten die isolierten Zellen eines beispielhaft gewählten Spenders allesamt eine Zusammensetzung an Oberflächenantigenen, die als charakteristisch, aber nicht spezifisch für MSCs gilt [68].

Eine Vielzahl früherer Studien konnte bereits die Expression der Oberflächenantigene CD44, CD73, CD90 und CD105 auf BM-MSCs nachweisen [51, 200-202]. Alsameh und Pretzel et al. zeigten, dass multipotente Vorläuferzellen aus gesundem und arthrotischem Knorpelgewebe positiv für die Antigene CD105 und CD166 waren [103, 203]. Frühere Arbeiten zeigten außerdem, dass CD73, CD90 und CD 105 positive Zellen aus dem vorderen

Kreuzband (VKB) des Kniegelenks [204, 205], sowie der synovialen Membran und Flüssigkeit der Hüftgelenkscapsel [50, 206] isoliert werden konnten. Diese Erkenntnisse unterstützen unsere Ergebnisse, die verdeutlichen, dass CD44, CD73, CD90 und CD105 positive Zellen auch aus dem LCF, sowie aus Gewebeproben, die die ganze Dicke der Hüftgelenkscapsel umfassen, isoliert werden können.

#### **4.3 Vergleich mit anderen in vitro Studien zur Isolation von MSCs aus unterschiedlichen Nativgeweben**

Obwohl Tavassoli und Crosby 1968 bereits das pro-osteogene Potential extramedullär transplantierten Knochenmarks de novo belegten [207], waren es später Friedenstein et al. die dieses auf eine Subpopulation nicht-hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarks zurückführen konnten [52, 53, 208]. Diese Zellen, die in der Lage waren fibröses Gewebe, Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe in vivo nachzubilden und als osteogene Knochenmark-Stammzellen bezeichnet wurden, bildeten die Vorläufer der heute als BM-MSCs bekannten Zellen [208-210]. Lokalisiert sind BM-MSCs höchstwahrscheinlich im Bereich der Zellen, die das Endost des Knochens, sowie das Endothel von Gefäßen auskleiden [211]. Bis heute ist das Knochenmark die am häufigsten verwendete Quelle zur Isolation von MSCs und gilt daher auch im klinischen Alltag als der Goldstandard, mit dem andere MSC-Subpopulationen verglichen werden [49, 212, 213].

Bisher gelang die Isolation multilinear differenzierbarer MSC-ähnlicher Zellen jedoch bereits aus einer Vielzahl weiterer, einfach zugänglicher Gewebe [49, 212, 214]. Alsalameh et al. zeigten bspw., dass multipotente MSC-ähnliche Zellen in großen Mengen in den oberflächlichen Zonen des arthrotisch vorgeschädigten Knorpel der Femurkondylen gefunden werden konnten [203]. Hiraoka et al. bestätigten diese Beobachtung im Jahr 2006 [215]. Im Gegensatz dazu existieren bisher keine Arbeiten, die eine mögliche Isolation von MSC-ähnlichen Zellen aus dem LCF oder Gewebeproben, die die ganze Dicke der Hüftgelenkscapsel umfassen, untersuchten.

Dennoch gibt es genügend Nachweise dafür, dass auch diese beiden Gewebe als Quellen für die Isolation von MSCs dienen könnten. MSC-ähnliche Zellen wurden bereits aus verschiedenen Bestandteilen der Gelenkscapsel des Hüftgelenks isoliert. Interessanterweise wurde für die Isolation der multipotenten Zellen jedoch lediglich Gewebe des Stratum synoviale verwendet, in dem MSC-ähnliche Zellen im Bereich der Synovialmembran lokalisiert sind [206, 216]. Zusätzlich isolierten verschiedene Arbeitsgruppen bereits Fibroblasten aus dem VKB und dem medialen Kollateralband (MCL) des Kniegelenks [217, 218]. 2008 konnten Huang et al. auch eine Subpopulation von mesenchymalen Vorläuferzellen, einige davon mit tripotentem

Differenzierungspotential, aus dem menschlichen VKB isolieren [219]. Cheng et. al und Steinert et al. bestätigten diesen Befund und isolierten MSC-ähnliche Zellen neben dem vorderen [205] auch aus dem hinteren Kreuzband (HKB) des Kniegelenks [204]. Innerhalb des VKBs waren die Zellen in den einzelnen Faszikeln des Ligaments, sowie in der endothelialen Auskleidung kleiner Gefäße lokalisiert [204]. Neuere Arbeiten zeigten, dass MSC-ähnliche Zellen zusätzlich auch in oberflächlich gelegenen Sinusoiden des VKBs liegen könnten [220]. Obwohl das LCF und das VKB zwei unterschiedliche Gewebe darstellen, weisen sie ähnliche histologische und anatomische Beschaffenheiten auf und formen beide intraartikuläre Ligamente, die von einer Synovialmembran überzogen sind [221]. Diese Befunde älterer Arbeiten unterstützen unsere neueren Ergebnisse, die zeigen, dass MSC-ähnliche Zellen auch aus dem LCF und Gewebeproben, die die volle Dicke der Hüftgelenkscapsel umfassen, isoliert werden können.

Des Weiteren stammen alle der vier untersuchten Gewebe - Spongiosa, Gelenkknorpel, das LCF und die Gelenkscapsel - aus Zellen des SPM und sind bis auf den Gelenkknorpel vaskularisiert. Berücksichtigt man neuere Studien zur embryonalen Entwicklung von MSCs, die einen engen Bezug zwischen endothelialen Perizyten und MSCs herstellten, so unterstützt dies die Ergebnisse unserer Studie [70]. Obwohl gesunder, hyaliner Knorpel als avaskulär gilt, kann arthrotisch veränderter Gelenkknorpel, der auch für die Isolation von MSC-ähnlichen Zellen in unserer Arbeit verwendet wurde, durch subchondrale Gefäße infiltriert werden, die potentielle MSC-ähnliche Zellen mit sich führen [222].

#### **4.4 Vergleich mit anderen in vitro Studien zur adipogenen und osteogenen Differenzierung von MSCs aus unterschiedlichen Nativgeweben**

Das multipotente Differenzierungspotential von MSCs variiert innerhalb verschiedener Subpopulationen. Daher stellt dieses Differenzierungspotential auch die Grundlage vieler wissenschaftlicher Arbeiten dar, deren Ziel es ist eine überlegene Quelle für die Isolation von MSCs für die Anwendung im klinischen Alltag zu etablieren. Wie bereits erwähnt gelten BM-MSCs als der wissenschaftliche Goldstandard, weshalb die Ergebnisse multipotenter Differenzierungen anderer MSC-ähnlicher Zellen häufig in Relation zu BM-MSCs gesetzt werden [49, 51, 57]. Das multipotente Differenzierungspotential von MSCs wurde bereits in einer Vielzahl von in vitro Studien untersucht und ist nach den Kriterien der ISCT eine obligate Voraussetzung für die Einstufung als MSCs [68]. Im Folgenden wurden daher die Ergebnisse der adipogenen und osteogenen Differenzierung der Zellen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Gelenkscapsel in Relation zu vergleichbaren in vitro Arbeiten gesetzt.

Eine Vielzahl von Studien untersuchte bereits das multipotente Differenzierungsverhalten von BM-MSCs [51, 74, 202]: Die adipogene Differenzierung von BM-MSCs mit einem Differenzierungsmedium auf der Basis von IBMX, Dexamethason, Insulin und Indomethacin in Monolayer-Kulturen führte dabei zu einer Akkumulation mittels Oil Red O-Färbungen darstellbarer, intrazellulärer Lipidtröpfchen. Zusätzlich zeigte sich eine Steigerung der relativen Genexpression von LPL und PPAR $\gamma$  gegenüber den Negativkontrollen [51, 74].

Pittenger et al. und Nöth et al. zeigten, dass die osteogene Differenzierung von BM-MSCs mithilfe von Dexamethason, L-Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat in Monolayer-Kulturen zu histologisch darstellbaren Ablagerungen von Calcium-Ionen in der EZM und einer Zunahme der Expression osteogener Markergene wie ALP, Col I, OC und Osteopontin (OP) führte [51, 74]. Diese Ergebnisse konnten unter nahezu identischen Bedingungen in unserer Arbeit reproduziert werden.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch im Rahmen der osteogenen und adipogenen Differenzierung CD105 und CD166 positiver Zellen aus gesundem und arthrotischem Knorpelgewebe gezeigt werden [103, 203]. Nach adipogener Differenzierung dieser Zellen mittels IBMX, Dexamethason, Indomethacin und Insulin konnten histologisch intrazelluläre Lipidtröpfchen in vergleichbarer Größe, Menge und Intensität wie in differenzierten BM-MSCs dargestellt werden [103, 203]. Während der osteogenen Differenzierung der CD105 und CD166 positiven Zellen mithilfe eines auf Dexamethason, L-Ascorbat und  $\beta$ -Glycerophosphat basierenden Mediums zeigte sich eine positive Alizarinrot S-Färbung und eine gesteigerte ALP-Aktivität der Zellen [103, 203]. Zwar wertete keine dieser Arbeiten die Veränderungen der Genexpression in differenzierte MSCs aus, jedoch decken sich die histologischen Ergebnisse mit denen unserer Arbeit.

Da keine in vitro Studie zur Isolation von MSC-ähnlichen Zellen aus dem LCF oder Gewebeproben, die die gesamte Dicke der Hüftgelenkscapsel umfassen, existieren, verglichen wir ihr multipotentes Differenzierungspotential mit dem ähnlicher MSC-Subpopulationen aus synovialen Gelenken. Cheng et al. differenzierten in ihrer Arbeit CD73, CD90 und CD105 positive Zellen aus beiden Kreuzbändern des menschlichen Kniegelenks mit spezifischen Mediumkombinationen adipogen und osteogen [204]. Eine positive Oil Red O-Färbung lieferte in Kombination mit der erhöhten, relativen Genexpression von PPAR $\gamma$  den Nachweis für eine erfolgreiche Adipogenese der MSC-ähnlichen Zellen [204]. Im Rahmen der osteogenen Differenzierung kam es nach zwei Wochen zu einer nachweislichen Erhöhung der ALP-Aktivität und nach drei Wochen zu einer positiven Alizarinrot S-Färbung. Aus molekularbiologischer Sicht äußerte sich dies in einer gesteigerten relativen Genexpression der osteogenen Markergene OC, OP und Col I gegenüber den Negativkontrollen [204]. Steinert et al. erkannten außerdem, dass sich weder das adipogene noch das osteogene Differenzierungspotential aus dem VKB isolierter MSC-ähnlicher Zellen signifikant von dem

der BM-MSCs unterschied. Diese Befunde decken sich mit den in unserer Arbeit dokumentierten Ergebnissen der osteogenen und adipogenen Differenzierung von MSC-ähnlichen Zellen aus dem LCF des Hüftgelenks.

Ähnliche Ergebnisse lieferten verschiedene Arbeiten für CD90 und CD105 positive MSC-ähnliche Zellen aus der Synovialmembran des Knie- und Hüftgelenks, die auch nach hoher Passagezahl erfolgreich adipogen und osteogen differenziert werden konnten [206, 223-225]. In vitro Studien, die im Vergleich zu BM-MSCs Hinweise für ein überlegenes adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential von MSC-ähnlichen Zellen aus der Synovialmembran fanden [223], decken sich nicht mit den Ergebnissen unserer Studie. Für keinen der beiden Differenzierungswege zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen MSC-ähnlichen Zellen aus dem Kapselgewebe und BM-MSCs.

#### **4.5 Vergleich mit anderen in vitro Studien zur chondrogenen Differenzierung von MSCs aus unterschiedlichen Nativgeweben**

Neben der Fähigkeit zur bereits diskutierten adipogenen und osteogenen Differenzierung müssen MSCs nach Definition der ISCT in vitro chondrogen differenzierbar sein [68]. MSCs besitzen großes Potential für die zellbasierte Regeneration von Knorpeldefekten, unterscheiden sich häufig jedoch vor allem im Hinblick auf ihr chondrogenes Differenzierungspotential. Daher wurde dieser Differenzierungsweg gesondert diskutiert. Dafür wurden unsere Ergebnisse zur chondrogenen Differenzierung der BM-MSCs und MSC-ähnlichen Zellen mit verschiedenen in vitro Studien zur Isolation und chondrogenen Differenzierung von ähnlichen MSC-Subpopulationen verglichen.

Johnstone et al. differenzierten BM-MSCs unter Zusatz von Dexamethason und TGF- $\beta$ 1 in dreidimensionalen Pellet-Kulturen chondrogen [106]. In den in TGF- $\beta$ 1 kultivierten BM-MSCs konnten nach 7 d histologisch Proteoglykane und immunhistochemisch Col II-Moleküle, sowie eine gesteigerte Expression des Col II-Gens nachgewiesen werden. Nach 14 d zeigten sich phänotypisch und durch den immunhistochemischen Nachweis von Col X erste Anzeichen der hypertrophen Differenzierung in den BM-MSCs. Durch RT-PCR konnte bereits nach 7 d mRNA hypertropher oder osteogener Markergene wie Col X und ALP in den chondrogen differenzierten Pellets nachgewiesen werden [106]. Vergleichbare Effekte auf BM-MSCs konnten mittlerweile durch die Verwendung verschiedenster Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie, wie TGF- $\beta$ 3, BMP-2, BMP-6 oder BMP-7, alleine oder in Kombination erzielt werden [148, 226, 227]. Ähnlich wie in älteren Arbeiten kam es im Zuge der chondrogenen Differenzierung von BM-MSCs mittels TGF- $\beta$ 1 auch in unserer Studie zu einer gesteigerten

Bildung knorpelspezifischer Matrixproteine, des hypertrophen Matrixproteins Col X, sowie zu einer gesteigerten Expression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und Sox-9.

Die chondrogene Differenzierung von Pellets, die MSC-ähnliche Zellen aus arthrotisch geschädigtem Knorpelgewebe des Kniegelenks enthielten, mit TGF- $\beta$ 1 führte nach einer Woche zu einer positiven Nachweise von Proteoglykanen und Col II [203]. Wie in unserer Studie auch zeigten sich im Vergleich zu BM-MSCs im Zuge der Chondrogenese keine optisch erkennbaren Unterschiede zwischen histologischen und immunhistochemischen Färbungen [203]. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigten Pretzel et al., dass die chondrogene Differenzierung von MSC-ähnlichen Zellen aus Knorpelgewebe mittels TGF- $\beta$ 3 zu einer gesteigerten Expression der chondrogenen Markergene AGG und Col II führte, die sich nicht signifikant von der in BM-MSCs unterschied.

In MSC-ähnlichen Zellen aus dem VKB und HKB des Kniegelenks, die mithilfe von TGF- $\beta$ 1 chondrogen differenziert wurden, kam es zu einer gesteigerten Produktion von Proteoglykanen [204]. Steinert et al. bestätigten diese Ergebnisse und beobachteten zusätzlich einen starken Zuwachs von Col II in Pellet-Querschnitten aus dem VKB [205]. Trotz der für hyalinen Knorpel typischen, lakunenartigen Anordnung der Zellen, zeigte sich in der Arbeit von Steinert et al. eine inhomogene Anordnung der Matrixproteine innerhalb der VKB-Pellets [205]. Beide Arbeiten von Cheng et al. und Steinert et al. wiesen eine gesteigerte Expression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in chondrogen differenzierten MSC-ähnlichen Zellen aus dem VKB nach [204, 205]. Im Vergleich zu den MSC-ähnlichen Zellen aus dem VKB fehlte in chondrogen differenzierten MSC-ähnlichen Zellen aus dem LCF in unserer Arbeit die Ausbildung lakunenartiger Chondrone und immunhistochemische Färbungen des Matrixproteins Col II fielen negativ aus. Überraschenderweise zeigten sich ähnlich wie in der Arbeit von Steinert et al. keine Unterschiede hinsichtlich der relativen Genexpression der chondrogenen Markergene zwischen BM-MSCs und MSC-ähnlichen Zellen aus dem LCF [205].

Wie in anderen synovialen Gelenken auch, wird die Innenseite der Hüftgelenkkapsel von einer synovialen Membran, dem sog. Stratum synoviale der Gelenkkapsel, überzogen. Aus dem Stratum synoviale der Gelenkkapsel der Knieinnenseite konnten De Bari et al. multipotent differenzierbare MSC-ähnliche Zellen isolieren [224, 228]. Die chondrogene Differenzierung dieser Zellen mittels TGF- $\beta$ 1 in Pellet-Kulturen führte dabei zu einer vermehrten Bildung von Proteoglykanen, sowie zu einer gesteigerten Bildung und Expression von Col II und Col X [224]. Sakaguchi et al. dokumentierten bei der chondrogen Differenzierung der Pellets dieser synovialen MSC-ähnlichen Zellen eine stärkere Zunahme an Größe und Gewicht als bei differenzierten Pellets, die BM-MSCs enthielten [50]. Dies deutet auf ein möglicherweise überlegenes chondrogenes Differenzierungspotential der synovialen MSC-ähnlichen Zellen hin, da die Zunahme der Pellets an Größe und Gewicht am ehesten auf eine gesteigerte

Produktion knorpelspezifischer extrazellulärer Matrixproteine wie Proteoglykanen und Col II zurückzuführen war [50]. Im Vergleich zu synovialen MSC-ähnlichen Zellen aus Kniegelenken, zeigten aus dem Hüftgelenk isolierte, synoviale MSC-ähnliche Zellen ein vergleichbares chondrogenes Differenzierungspotential, das sich lediglich durch die weniger stark gesteigerte Genexpression von Col II auszeichnete [206]. Die in dieser Arbeit verwendeten MSC-ähnlichen Zellen wurden aus Gewebeproben der Hüftgelenkscapsel isoliert, die neben dem Stratum synoviale auch das Stratum fibrosum beinhalteten. Obwohl auch diese Zellen unter Zusatz von TGF- $\beta$ 1 erfolgreich chondrogen differenziert werden konnten, zeigte sich anders als in der Arbeit von Sakaguchi et al. kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum chondrogenen Differenzierungspotential von BM-MSCs [50].

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass plastik-adhärenz wachsende, multipotente Vorläuferzellen, die eine für MSCs charakteristische Kombination von Oberflächenantigenen tragen, aus allen vier untersuchten Geweben des arthrotischen Hüftgelenks isoliert werden konnten. MSC-ähnliche Zellen können somit nicht nur in der Spongiosa und im Gelenknorpel, sondern auch in der anterioren Gelenkkapsel und dem LCF des arthrotisch veränderten menschlichen Hüftgelenks nachgewiesen werden.

Die FACS Analyse der Oberflächenantigene auf Zellen, die aus den vier unterschiedlichen Geweben eines beispielhaft gewählten Spenders isoliert wurden, zeigte eine deutliche Expression der Antigene CD44, CD73, CD90 und CD105. Unabhängig vom Nativgewebe zeigten somit alle untersuchten Zellen ein für MSCs charakteristisches, aber nicht spezifisches Profil an Antigenen auf ihrer Oberfläche. Eine Übereinstimmung mit den ISCT Kriterien für MSCs war aufgrund der fehlenden Kontrolle hämatopoetischer Marker nicht möglich.

Die multipotente Differenzierung der isolierten Zellen erfolgte mithilfe spezifischer Differenzierungsmedien in Monolayer-Kulturen (21 d) oder für die chondrogene Differenzierung in dreidimensionalen Pellet-Kulturen (27 d). Nach 21 d konnten in allen differenzierten Kulturen histologisch und immunhistochemisch klare Zeichen der Osteo- und Adipogenese detektiert werden, während die Auswertung spezifischer Markergene eine klare Steigerung der Expression dieser im Vergleich zu den Negativkontrollen zeigte.

Histologische und immunhistochemische Auswertungen bestätigten auch eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung der Zell-Pellets aus Spongiosa, Knorpel und Kapsel. Lediglich in den chondrogen differenzierten Zell-Pellets aus dem LCF konnte immunhistochemisch keine Bildung des knorpelspezifischen Matrixproteins Col II nachgewiesen werden. Mikroskopisch zeigten vor allem die differenzierten MSC-Pellets aus Spongiosa und Knorpel morphologisch eine starke Ähnlichkeit zu hyalinem Knorpelgewebe. Trotz dieser Abstufungen zeigten sich für die relative Expression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und Sox-9 keine signifikanten Unterschiede zwischen den differenzierten MSC-Kulturen der vier unterschiedlichen Nativgewebe. Ein positiver Nachweis des Markers Col X wies nach 27 d sowohl in differenzierten als auch in undifferenzierten Pellet-Kulturen auf eine leichte chondrogene Hypertrophie hin. Zusammenfassend zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das osteogene und adipogene Differenzierungspotential aller untersuchten Zellen. Während das chondrogene Differenzierungspotential der Zellen aus Spongiosa, Knorpel und Kapsel sich aus histologischer und immunhistochemischer Sicht ähnelte, zeigten Pellets aus dem LCF ein schwächeres chondrogenes Differenzierungspotential in vitro.

Obwohl somit erstmals MSC-ähnliche Zellen aus dem LCF und Gewebeproben, die neben dem Stratum synoviale auch das Stratum fibrosum der Hüftgelenkkapsel beinhalteten,

charakterisiert wurden, sind weitere wissenschaftliche Arbeiten notwendig, um das multipotente Differenzierungspotential dieser Zellen zu optimieren.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Newman, A.P., *Articular cartilage repair*. Am J Sports Med, 1998. **26**(2): p. 309-24.
2. Hunziker, E.B., *Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(6): p. 432-63.
3. Hayes, D.W., Jr., R.L. Brower, and K.J. John, *Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair*. Clin Podiatr Med Surg, 2001. **18**(1): p. 35-53.
4. Pereira, D., E. Ramos, and J. Branco, *Osteoarthritis*. Acta Med Port, 2015. **28**(1): p. 99-106.
5. Frenkel, S.R. and P.E. Di Cesare, *Degradation and repair of articular cartilage*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D671-85.
6. Caplan, A.I., et al., *Principles of cartilage repair and regeneration*. Clin Orthop Relat Res, 1997(342): p. 254-69.
7. Schmidt, M.B., E.H. Chen, and S.E. Lynch, *A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(5): p. 403-12.
8. Zhen, G. and X. Cao, *Targeting TGFbeta signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis*. Trends Pharmacol Sci, 2014. **35**(5): p. 227-36.
9. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage repair and transplantation*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(8): p. 1331-42.
10. Shapiro, F., S. Koide, and M.J. Glimcher, *Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1993. **75**(4): p. 532-53.
11. Furukawa, T., et al., *Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee*. J Bone Joint Surg Am, 1980. **62**(1): p. 79-89.
12. Outerbridge, R.E., *The etiology of chondromalacia patellae*. J Bone Joint Surg Br, 1961. **43-b**: p. 752-7.
13. Brittberg, M. and C.S. Winalski, *Evaluation of cartilage injuries and repair*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 58-69.
14. Niemeyer, P., et al., *Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU)*. Knee, 2016. **23**(3): p. 426-35.
15. Steadman, J.R., W.G. Rodkey, and J.J. Rodrigo, *Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects*. Clin Orthop Relat Res, 2001(391 Suppl): p. S362-9.
16. Muller, B. and D. Kohn, *[Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method]*. Orthopade, 1999. **28**(1): p. 4-10.
17. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(14): p. 889-95.
18. Minas, T. and S. Nehler, *Current concepts in the treatment of articular cartilage defects*. Orthopedics, 1997. **20**(6): p. 525-38.
19. Marlovits, S., et al., *Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation*. Eur J Radiol, 2006. **57**(1): p. 24-31.
20. Oussedik, S., K. Tsitskaris, and D. Parker, *Treatment of articular cartilage lesions of the knee by microfracture or autologous chondrocyte implantation: a systematic review*. Arthroscopy, 2015. **31**(4): p. 732-44.
21. Welch, T., B. Mandelbaum, and M. Tom, *Autologous Chondrocyte Implantation: Past, Present, and Future*. Sports Med Arthrosc Rev, 2016. **24**(2): p. 85-91.
22. Mistry, H., et al., *Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation*. Health Technol Assess, 2017. **21**(6): p. 1-294.
23. Matsiko, A., T.J. Levingstone, and F.J. O'Brien, *Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair*. Materials (Basel), 2013. **6**(2): p. 637-668.
24. Makris, E.A., et al., *Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(1): p. 21-34.
25. Steinert, A.F., et al., *Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**(3): p. 213.

26. Steinert, A.F., U. Noth, and R.S. Tuan, *Concepts in gene therapy for cartilage repair*. Injury, 2008. **39 Suppl 1**: p. S97-113.
27. Nixon, A.J., et al., *A chondrocyte infiltrated collagen type I/III membrane (MACI(R) implant) improves cartilage healing in the equine patellofemoral joint model*. Osteoarthritis Cartilage, 2015. **23(4)**: p. 648-60.
28. Basad, E., et al., *Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010. **18(4)**: p. 519-27.
29. Peterson, L., et al., *Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up*. Am J Sports Med, 2010. **38(6)**: p. 1117-24.
30. Bobic, V., *[Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions]*. Orthopade, 1999. **28(1)**: p. 19-25.
31. Richter, D.L., et al., *Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature*. Sports Health, 2016. **8(2)**: p. 153-60.
32. Hangody, L. and P. Fules, *Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 25-32.
33. Kuo, C.K., et al., *Cartilage tissue engineering: its potential and uses*. Curr Opin Rheumatol, 2006. **18(1)**: p. 64-73.
34. Wakitani, S., et al., *Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1994. **76(4)**: p. 579-92.
35. Wakitani, S., et al., *Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports*. Cell Transplant, 2004. **13(5)**: p. 595-600.
36. Kuroda, R., et al., *Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15(2)**: p. 226-31.
37. Fortier, L.A., et al., *The role of growth factors in cartilage repair*. Clin Orthop Relat Res, 2011. **469(10)**: p. 2706-15.
38. Blunk, T., et al., *Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage*. Tissue Eng, 2002. **8(1)**: p. 73-84.
39. Nestic, D., et al., *Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58(2)**: p. 300-22.
40. Douchis, J.S., et al., *Cartilage repair with autogenic perichondrium cell and polylactic acid grafts*. Clin Orthop Relat Res, 2000(377): p. 248-64.
41. Cohen, S.B., et al., *The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits*. Biomaterials, 2003. **24(15)**: p. 2653-60.
42. Hendrickson, D.A., et al., *Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects*. J Orthop Res, 1994. **12(4)**: p. 485-97.
43. Frenkel, S.R. and P.E. Di Cesare, *Scaffolds for articular cartilage repair*. Ann Biomed Eng, 2004. **32(1)**: p. 26-34.
44. Klein, T.J., et al., *Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations*. Osteoarthritis Cartilage, 2003. **11(8)**: p. 595-602.
45. Wang, Y., S. Shang, and C. Li, *Aligned Biomimetic Scaffolds as a New Tendency in Tissue Engineering*. Curr Stem Cell Res Ther, 2016. **11(1)**: p. 3-18.
46. Spiller, K.L., S.A. Maher, and A.M. Lowman, *Hydrogels for the repair of articular cartilage defects*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17(4)**: p. 281-99.
47. Bauge, C. and K. Boumediene, *Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments*. Stem Cells Int, 2015. **2015**: p. 438026.
48. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7(2)**: p. 211-28.
49. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 12.

50. Sakaguchi, Y., et al., *Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(8): p. 2521-9.
51. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
52. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, Il, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. *J Embryol Exp Morphol*, 1966. **16**(3): p. 381-90.
53. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. *Exp Hematol*, 1976. **4**(5): p. 267-74.
54. Fraser, J.K., et al., *Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology*. *Trends Biotechnol*, 2006. **24**(4): p. 150-4.
55. Cardoso, T.C., et al., *Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system*. *BMC Biotechnol*, 2012. **12**: p. 18.
56. Soncini, M., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007. **1**(4): p. 296-305.
57. Ahmed, T.A. and M.T. Hincke, *Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage*. *Histol Histopathol*, 2014. **29**(6): p. 669-89.
58. Eglitis, M.A., et al., *Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain*. *Neuroreport*, 1999. **10**(6): p. 1289-92.
59. Chen, J., et al., *Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat*. *J Neurosci Res*, 2003. **73**(6): p. 778-86.
60. Mezey, E., et al., *Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(3): p. 1364-9.
61. Rohban, R. and T.R. Pieber, *Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential*. *Stem Cells Int*, 2017. **2017**: p. 5173732.
62. Huang, C., J. Dai, and X.A. Zhang, *Environmental physical cues determine the lineage specification of mesenchymal stem cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1850**(6): p. 1261-6.
63. Brochhausen, C., et al., *Signalling molecules and growth factors for tissue engineering of cartilage-what can we learn from the growth plate?* *J Tissue Eng Regen Med*, 2009. **3**(6): p. 416-29.
64. Worster, A.A., et al., *Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix*. *J Orthop Res*, 2001. **19**(4): p. 738-49.
65. Worster, A.A., et al., *Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells*. *Am J Vet Res*, 2000. **61**(9): p. 1003-10.
66. Almalki, S.G. and D.K. Agrawal, *Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells*. *Differentiation*, 2016. **92**(1-2): p. 41-51.
67. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
68. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy*, 2005. **7**(5): p. 393-5.
69. Colter, D.C., et al., *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3213-8.
70. Caplan, A.I., *Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!* *Stem Cells Transl Med*, 2017. **6**(6): p. 1445-1451.
71. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(3): p. 301-13.
72. Alhadlaq, A. and J.J. Mao, *Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics*. *Stem Cells Dev*, 2004. **13**(4): p. 436-48.

73. Prockop, D.J., I. Sekiya, and D.C. Colter, *Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells*. *Cytotherapy*, 2001. **3**(5): p. 393-6.
74. Noth, U., et al., *Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells*. *J Orthop Res*, 2002. **20**(5): p. 1060-9.
75. Ding, D.C., et al., *Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy*. *Cell Transplant*, 2015. **24**(3): p. 339-47.
76. Pera, M.F., *Stem cells: The dark side of induced pluripotency*. *Nature*, 2011. **471**(7336): p. 46-7.
77. Gore, A., et al., *Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2011. **471**(7336): p. 63-7.
78. Cao, C., Y. Dong, and Y. Dong, *[Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells]*. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2005. **19**(8): p. 642-7.
79. Griffiths, M.J., D. Bonnet, and S.M. Janes, *Stem cells of the alveolar epithelium*. *Lancet*, 2005. **366**(9481): p. 249-60.
80. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. *Cell*, 2003. **114**(6): p. 763-76.
81. Leuning, D.G., et al., *The human kidney capsule contains a functionally distinct mesenchymal stromal cell population*. *PLoS One*, 2017. **12**(12): p. e0187118.
82. Wang, Y., et al., *Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases*. *Stem Cell Res Ther*, 2016. **7**(1): p. 71.
83. Kwon, A., et al., *Tissue-specific Differentiation Potency of Mesenchymal Stromal Cells from Perinatal Tissues*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 23544.
84. Joerger-Messerli, M.S., et al., *Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016. **31**: p. 30-44.
85. McElreavey, K.D., et al., *Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord*. *Biochem Soc Trans*, 1991. **19**(1): p. 29s.
86. Prasanna, S.J., et al., *Pro-inflammatory cytokines, IFNgamma and TNFalpha, influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9016.
87. Cho, P.S., et al., *Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells*. *Blood*, 2008. **111**(1): p. 430-8.
88. Kim, D.W., et al., *Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(6): p. 11692-712.
89. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
90. Oedayrajsingh-Varma, M.J., et al., *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(2): p. 166-77.
91. Yu, G., et al., *Adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells*. *Methods Mol Biol*, 2011. **702**: p. 193-200.
92. Kroeze, R.J., M. Knippenberg, and M.N. Helder, *Osteogenic differentiation strategies for adipose-derived mesenchymal stem cells*. *Methods Mol Biol*, 2011. **702**: p. 233-48.
93. Roux, C., et al., *Chondrogenic potential of stem cells derived from adipose tissue: a powerful pharmacological tool*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **440**(4): p. 786-91.
94. Erickson, G.R., et al., *Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **290**(2): p. 763-9.
95. Afizah, H., et al., *A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors*. *Tissue Eng*, 2007. **13**(4): p. 659-66.

96. Havlas, V., et al., *[Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells]*. Acta Chir Orthop Traumatol Cech, 2011. **78**(2): p. 138-44.
97. Hao, Z., et al., *[Comparison of biological characteristics between bone marrow mesenchymal stem cells and anterior cruciate ligament derived mesenchymal stem cells in rats]*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2017. **31**(4): p. 473-480.
98. Kristjansson, B., et al., *Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells From Facet Joints and Interspinous Ligaments*. Spine (Phila Pa 1976), 2016. **41**(1): p. E1-7.
99. Lee, J.C., et al., *Synovial membrane-derived mesenchymal stem cells supported by platelet-rich plasma can repair osteochondral defects in a rabbit model*. Arthroscopy, 2013. **29**(6): p. 1034-46.
100. Morito, T., et al., *Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(8): p. 1137-43.
101. Sekiya, I., et al., *Arthroscopic Transplantation of Synovial Stem Cells Improves Clinical Outcomes in Knees With Cartilage Defects*. Clin Orthop Relat Res, 2015. **473**(7): p. 2316-26.
102. Akgun, I., et al., *Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study*. Arch Orthop Trauma Surg, 2015. **135**(2): p. 251-263.
103. Pretzel, D., et al., *Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(2): p. R64.
104. Williams, R., et al., *Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13246.
105. Jayasuriya, C.T. and Q. Chen, *Potential benefits and limitations of utilizing chondroprogenitors in cell-based cartilage therapy*. Connect Tissue Res, 2015. **56**(4): p. 265-71.
106. Johnstone, B., et al., *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Exp Cell Res, 1998. **238**(1): p. 265-72.
107. Gugjoo, M.B., et al., *Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds*. Indian J Med Res, 2016. **144**(3): p. 339-347.
108. Richardson, S.M., et al., *Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration*. Methods, 2016. **99**: p. 69-80.
109. Sekiya, I., et al., *In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4397-402.
110. Im, G.I., *Tissue Engineering in Osteoarthritis: Current Status and Prospect of Mesenchymal Stem Cell Therapy*. BioDrugs, 2018. **32**(3): p. 183-192.
111. Karlsson, C., et al., *Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors*. J Orthop Res, 2007. **25**(2): p. 152-63.
112. Steinert, A.F., et al., *Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. R148.
113. Dickhut, A., et al., *Calcification or dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage*. J Cell Physiol, 2009. **219**(1): p. 219-26.
114. Li, M.H., et al., *Regenerative approaches for cartilage repair in the treatment of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2017. **25**(10): p. 1577-1587.
115. Pelttari, K., et al., *Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(10): p. 3254-66.
116. Mackie, E.J., L. Tatarczuch, and M. Mirams, *The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification*. J Endocrinol, 2011. **211**(2): p. 109-21.

117. Vortkamp, A., et al., *Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein*. Science, 1996. **273**(5275): p. 613-22.
118. Goldring, M.B., K. Tsuchimochi, and K. Ijiri, *The control of chondrogenesis*. J Cell Biochem, 2006. **97**(1): p. 33-44.
119. Scott, M.A., et al., *Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(10): p. 1793-804.
120. Farmer, S.R., *Transcriptional control of adipocyte formation*. Cell Metab, 2006. **4**(4): p. 263-73.
121. Pfutzner, A., et al., *Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Adipocytes Is Equally Induced by Insulin and Proinsulin In Vitro*. Int J Stem Cells, 2017. **10**(2): p. 154-159.
122. Chen, Q., et al., *Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?* Cell Death Differ, 2016. **23**(7): p. 1128-39.
123. Prusty, D., et al., *Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46226-32.
124. Cornelius, P., O.A. MacDougald, and M.D. Lane, *Regulation of adipocyte development*. Annu Rev Nutr, 1994. **14**: p. 99-129.
125. Summers, S.A., et al., *Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **892**: p. 169-86.
126. Draznin, B., *Mitogenic action of insulin: friend, foe or 'frenemy'?* Diabetologia, 2010. **53**(2): p. 229-33.
127. Cao, Z., R.M. Umek, and S.L. McKnight, *Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells*. Genes Dev, 1991. **5**(9): p. 1538-52.
128. Song, I.H., A.I. Caplan, and J.E. Dennis, *Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 2009. **27**(2): p. 216-21.
129. Wang, H., et al., *Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells*. Cytotherapy, 2012. **14**(4): p. 423-30.
130. Derfoul, A., et al., *Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes*. Stem Cells, 2006. **24**(6): p. 1487-95.
131. Langenbach, F. and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. Stem Cell Res Ther, 2013. **4**(5): p. 117.
132. Wu, Z., et al., *Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity*. Mol Cell, 1999. **3**(2): p. 151-8.
133. Mosesti, D., A. Regassa, and W.K. Kim, *Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(1).
134. Rosen, E.D., et al., *C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 22-6.
135. Wu, H.T., et al., *Indomethacin activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma to improve insulin resistance in cotton pellet granuloma model*. Horm Metab Res, 2010. **42**(11): p. 775-80.
136. Rosen, E.D., et al., *Transcriptional regulation of adipogenesis*. Genes Dev, 2000. **14**(11): p. 1293-307.
137. Darlington, G.J., S.E. Ross, and O.A. MacDougald, *The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30057-60.
138. Song, I.H., A.I. Caplan, and J.E. Dennis, *In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo*. J Orthop Res, 2009. **27**(7): p. 916-21.
139. Tada, H., et al., *Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells*. Bone, 2011. **48**(6): p. 1409-16.

140. Fatherazi, S., et al., *Phosphate regulates osteopontin gene transcription*. J Dent Res, 2009. **88**(1): p. 39-44.
141. Hamidouche, Z., et al., *FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression*. Faseb j, 2008. **22**(11): p. 3813-22.
142. Hong, D., et al., *Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009. **116**(1-2): p. 86-92.
143. Vater, C., P. Kasten, and M. Stiehler, *Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells*. Acta Biomater, 2011. **7**(2): p. 463-77.
144. Franceschi, R.T. and B.S. Iyer, *Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells*. J Bone Miner Res, 1992. **7**(2): p. 235-46.
145. James, A.W., *Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation*. Scientifica (Cairo), 2013. **2013**: p. 684736.
146. Komori, T., *Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development*. J Bone Miner Metab, 2003. **21**(4): p. 193-7.
147. Komori, T., *Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 189-95.
148. Krstic, J., et al., *Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation by Transforming Growth Factor Beta Superfamily*. Curr Protein Pept Sci, 2018. **19**(12): p. 1138-1154.
149. Frenkel, S.R., et al., *Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling*. Plast Reconstr Surg, 2000. **105**(3): p. 980-90.
150. Wang, W., D. Rigueur, and K.M. Lyons, *TGFbeta signaling in cartilage development and maintenance*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2014. **102**(1): p. 37-51.
151. Li, J. and S. Dong, *The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 2470351.
152. Yoon, B.S., et al., *Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5062-7.
153. Chavez, R.D., et al., *SOX9 protein is stabilized by TGF-beta and regulates PAPSS2 mRNA expression in chondrocytes*. Osteoarthritis Cartilage, 2017. **25**(2): p. 332-340.
154. Yang, B., et al., *MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21679.
155. Weissenberger, M., et al., *Reduced hypertrophy in vitro after chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells following adenoviral SOX9 gene delivery*. BMC Musculoskelet Disord, 2020. **21**(1): p. 109.
156. Longobardi, L., et al., *Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(4): p. 626-36.
157. Loeser, R.F., C.A. Pacione, and S. Chubinskaya, *The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p. 2188-96.
158. Steinert, A.F., et al., *Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(4): p. R168.
159. St-Jacques, B., M. Hammerschmidt, and A.P. McMahon, *Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation*. Genes Dev, 1999. **13**(16): p. 2072-86.
160. Trippel, S.B., S.C. Ghivizzani, and A.J. Nixon, *Gene-based approaches for the repair of articular cartilage*. Gene Ther, 2004. **11**(4): p. 351-9.
161. Cucchiaroni, M., *New cell engineering approaches for cartilage regenerative medicine*. Biomed Mater Eng, 2017. **28**(s1): p. S201-s207.
162. Oligino, T.J., et al., *Vector systems for gene transfer to joints*. Clin Orthop Relat Res, 2000(379 Suppl): p. S17-30.

163. Conget, P.A. and J.J. Minguell, *Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone marrow mesenchymal progenitor cells*. *Exp Hematol*, 2000. **28**(4): p. 382-90.
164. Benihoud, K., P. Yeh, and M. Perricaudet, *Adenovirus vectors for gene delivery*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999. **10**(5): p. 440-7.
165. Gouze, E., et al., *In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors*. *Mol Ther*, 2002. **5**(4): p. 397-404.
166. Huang, K., et al., *Cartilage Tissue Regeneration: The Roles of Cells, Stimulating Factors and Scaffolds*. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018. **13**(7): p. 547-567.
167. Im, G.I., N.H. Jung, and S.K. Tae, *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(3): p. 527-36.
168. Puetzer, J.L., J.N. Petite, and E.G. Loba, *Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010. **16**(4): p. 435-44.
169. Murray, S.S., et al., *The history and histology of bone morphogenetic protein*. *Histol Histopathol*, 2016. **31**(7): p. 721-32.
170. Dahlin, R.L., et al., *TGF-beta3-induced chondrogenesis in co-cultures of chondrocytes and mesenchymal stem cells on biodegradable scaffolds*. *Biomaterials*, 2014. **35**(1): p. 123-32.
171. Zhou, N., et al., *BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells*. *Cell Tissue Res*, 2016. **366**(1): p. 101-11.
172. Chubinskaya, S., M. Hurtig, and D.C. Rueger, *OP-1/BMP-7 in cartilage repair*. *Int Orthop*, 2007. **31**(6): p. 773-81.
173. Cheng, T., et al., *Fibroblast growth factor 2 enhances the kinetics of mesenchymal stem cell chondrogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **426**(4): p. 544-50.
174. Stewart, A.A., et al., *Effect of fibroblast growth factor-2 on equine mesenchymal stem cell monolayer expansion and chondrogenesis*. *Am J Vet Res*, 2007. **68**(9): p. 941-5.
175. Barry, F., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components*. *Exp Cell Res*, 2001. **268**(2): p. 189-200.
176. Shi, S., et al., *Growth factor regulation of growth factors in articular chondrocytes*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(11): p. 6697-704.
177. Kock, L., C.C. van Donkelaar, and K. Ito, *Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status*. *Cell Tissue Res*, 2012. **347**(3): p. 613-27.
178. Zhao, L. and B.M. Hantash, *TGF-beta1 regulates differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells*. *Vitam Horm*, 2011. **87**: p. 127-41.
179. Grimaud, E., D. Heymann, and F. Redini, *Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. **13**(3): p. 241-57.
180. Bi, W., et al., *Sox9 is required for cartilage formation*. *Nat Genet*, 1999. **22**(1): p. 85-9.
181. Jiang, X., et al., *The role of Sox9 in collagen hydrogel-mediated chondrogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells (MSCs)*. *Biomater Sci*, 2018. **6**(6): p. 1556-1568.
182. Vortkamp, A., *Interaction of growth factors regulating chondrocyte differentiation in the developing embryo*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. **9 Suppl A**: p. S109-17.
183. Jahr, H., C. Matta, and A. Mobasheri, *Physicochemical and biomechanical stimuli in cell-based articular cartilage repair*. *Curr Rheumatol Rep*, 2015. **17**(3): p. 22.
184. Wagner, D.R., et al., *Hydrostatic pressure enhances chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in osteochondrogenic medium*. *Ann Biomed Eng*, 2008. **36**(5): p. 813-20.
185. Kisiday, J.D., et al., *Dynamic compression stimulates proteoglycan synthesis by mesenchymal stem cells in the absence of chondrogenic cytokines*. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(10): p. 2817-24.

186. Yoo, J.U., et al., *The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(12): p. 1745-57.
187. Izadifar, Z., X. Chen, and W. Kulyk, *Strategic design and fabrication of engineered scaffolds for articular cartilage repair*. J Funct Biomater, 2012. **3**(4): p. 799-838.
188. Watts, A.E., J.C. Ackerman-Yost, and A.J. Nixon, *A comparison of three-dimensional culture systems to evaluate in vitro chondrogenesis of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(19-20): p. 2275-83.
189. Cancedda, R., et al., *Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone*. Matrix Biol, 2003. **22**(1): p. 81-91.
190. Nam, Y., et al., *Current Therapeutic Strategies for Stem Cell-Based Cartilage Regeneration*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 8490489.
191. Kim, I.L., R.L. Mauck, and J.A. Burdick, *Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid*. Biomaterials, 2011. **32**(34): p. 8771-82.
192. Klein, T.J., et al., *Strategies for zonal cartilage repair using hydrogels*. Macromol Biosci, 2009. **9**(11): p. 1049-58.
193. Mouw, J.K., et al., *Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. **13**(9): p. 828-36.
194. Li, W.J., et al., *A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2005. **26**(6): p. 599-609.
195. Cucchiaroni, M. and H. Madry, *Gene therapy for cartilage defects*. J Gene Med, 2005. **7**(12): p. 1495-509.
196. Gelse, K., K. von der Mark, and H. Schneider, *Cartilage regeneration by gene therapy*. Curr Gene Ther, 2003. **3**(4): p. 305-17.
197. Mi, Z., et al., *Adverse effects of adenovirus-mediated gene transfer of human transforming growth factor beta 1 into rabbit knees*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(3): p. R132-9.
198. Gelse, K., et al., *Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1943-53.
199. Steinert, A.F., et al., *Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(5): p. 1127-39.
200. Segawa, Y., et al., *Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles*. J Orthop Res, 2009. **27**(4): p. 435-41.
201. Li, X., et al., *Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation*. Int J Mol Med, 2014. **34**(3): p. 695-704.
202. Baghaei, K., et al., *Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow*. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 2017. **10**(3): p. 208-213.
203. Alsalameh, S., et al., *Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(5): p. 1522-32.
204. Cheng, M.T., et al., *Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments*. Cell Prolif, 2009. **42**(4): p. 448-60.
205. Steinert, A.F., et al., *Mesenchymal stem cell characteristics of human anterior cruciate ligament outgrowth cells*. Tissue Eng Part A, 2011. **17**(9-10): p. 1375-88.
206. Hatakeyama, A., et al., *Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cell Derived from Hip Joints: A Comparative Analysis with a Matched Control Knee Group*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 9312329.
207. Tavassoli, M. and W.H. Crosby, *Transplantation of marrow to extramedullary sites*. Science, 1968. **161**(3836): p. 54-6.
208. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. Cell Tissue Kinet, 1987. **20**(3): p. 263-72.

209. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(4): p. 313-9.
210. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
211. Charbord, P., *Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(9): p. 1045-56.
212. Berebichez-Fridman, R. and P.R. Montero-Olvera, *Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2018. **18**(3): p. e264-e277.
213. Mafi, R., et al., *Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature*. Open Orthop J, 2011. **5 Suppl 2**: p. 242-8.
214. Tuan, R.S., G. Boland, and R. Tuli, *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(1): p. 32-45.
215. Hiraoka, K., et al., *Mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage*. Biorheology, 2006. **43**(3,4): p. 447-54.
216. Li, F., et al., *Nomenclature clarification: synovial fibroblasts and synovial mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2019. **10**(1): p. 260.
217. Nagineni, C.N., et al., *Characterization of the intrinsic properties of the anterior cruciate and medial collateral ligament cells: an in vitro cell culture study*. J Orthop Res, 1992. **10**(4): p. 465-75.
218. Lee, K.J., et al., *Ligament-Derived Stem Cells: Identification, Characterisation, and Therapeutic Application*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 1919845.
219. Huang, T.F., et al., *Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human anterior cruciate ligament*. Cytotherapy, 2008. **10**(8): p. 806-14.
220. Ogata, Y., et al., *Anterior cruciate ligament-derived mesenchymal stromal cells have a propensity to differentiate into the ligament lineage*. Regen Ther, 2018. **8**: p. 20-28.
221. O'Donnell, J.M., B.M. Devitt, and M. Arora, *The role of the ligamentum teres in the adult hip: redundant or relevant? A review*. J Hip Preserv Surg, 2018. **5**(1): p. 15-22.
222. Ashraf, S. and D.A. Walsh, *Angiogenesis in osteoarthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2008. **20**(5): p. 573-80.
223. Futami, I., et al., *Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45517.
224. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1928-42.
225. Fellows, C.R., et al., *Adipose, Bone Marrow and Synovial Joint-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair*. Front Genet, 2016. **7**: p. 213.
226. Indrawattana, N., et al., *Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(3): p. 914-9.
227. Yu, D.A., J. Han, and B.S. Kim, *Stimulation of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Int J Stem Cells, 2012. **5**(1): p. 16-22.
228. Nishimura, K., et al., *Chondroprogenitor cells of synovial tissue*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(12): p. 2631-7.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1** Beispielhaft dargestellte Auszählung (orange) der Zellen (rot) im linken oberen Eckquadrat einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop.
- Abbildung 2** 50- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der HE-Färbung von beispielhaften Nativproben der Spongiosa (1), des Hüftgelenksknorpels (2), des LCF (3) und der Hüftgelenkskapsel (4).
- Abbildung 3** Aufnahme des Wachstums der plastik-adhärenenten wachsenden BM-MSCs aus Spongiosa in Monolayer-Zellkulturen unter dem Phasenkontrast-Mikroskop in 100-facher Vergrößerung.
- Abbildung 4** Beispielhaft dargestellte durchflusszytometrisch ermittelte Verteilung der Co-Expression der Oberflächenantigene CD90/CD105 und CD73/CD44 der isolierten Zellen aus Spongiosa (a), Knorpel (b), LCF (c) und der Kapsel (d) der Hüftgelenke.
- Abbildung 5** 100-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der adipogenen Differenzierung (Diff.), sowie der dazugehörigen Negativkontrollen (Kontrolle) der Zellen aus Spongiosa (a) Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und anteriorer Hüftgelenkskapsel (d) nach 12 und 21 d.
- Abbildung 6** 100- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der histologischen Oil Red O-Färbung der Negativkontrollen (Kontrolle d 21) und adipogen differenzierten (Differenzierung d 21) der Zellen aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und anteriorer Hüftgelenkskapsel (d).
- Abbildung 7** Mittelwerte  $\pm$  SD der über semiquantitative RT-PCR ermittelten relativen Genexpression der adipogenen Markergene LPL und PPAR $\gamma$  in den differenzierten Kulturen von BM-MSCs und MSC-ähnliche Zellen aus Knorpel, LCF und Kapsel im Vergleich zu ihren Negativkontrollen.
- Abbildung 8** Ungefärbte, 100-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur mikroskopischen Beurteilung der Negativkontrollen (Kontrolle) und osteogen differenzierten Kulturen (Diff.) von Zellen aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und Hüftgelenkskapsel (d) nach 21 d.
- Abbildung 9** Histologische Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen in 100- und 200-facher Vergrößerung zur Beurteilung der Alizarinrot S-Färbung der undifferenzierten Kulturen (Kontrolle d 21) und differenzierter Kulturen (Differenzierung d 21) von Zellen aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel (b), LCF (c) und der Hüftgelenkskapsel (d) nach 21 d.
- Abbildung 10** Immunhistochemische Färbung von Col I in 100- und 200-facher (b,d) Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop zur Beurteilung der osteogen differenzierten (Differenzierung d 21) Zellen aus Spongiosa (a), Hüftgelenksknorpel

(b), LCF (c) und anteriorer Hüftgelenkscapsel (d), sowie ihrer Negativkontrollen (Kontrolle d 21) nach 21 d.

**Abbildung 11** Durch semiquantitative RT-PCR ermittelte Mittelwerte  $\pm$  SD der Veränderungen der relativen Genexpression osteogener Markergene Col I, Col X, ALP und OC in den differenzierten Kulturen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel im Vergleich zu den Negativkontrollen nach 21 d. Signifikante Unterschiede zwischen zwei MSC-Subpopulationen sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

**Abbildung 12** Vergleichende Darstellung der immunhistochemischen Färbung von Col I (1-4), sowie der im Vergleich zu den Negativkontrollen relativen, mittleren Genexpression des osteogenen Markergens Col I (5) in osteogen differenzierten Zell-Kulturen aus Spongiosa (1, 5), Knorpel (2, 5), LCF (3, 5) und Gelenkscapsel (4, 5).

**Abbildung 13** 50- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Chondrogenese mithilfe der Alcianblau-Färbung der Negativkontrollen (Kontrolle d 27) und differenzierten Pellets (Differenzierung d 27) aus Spongiosa (a), Hüftgelenkscapsel (b), LCF (c) und der Hüftgelenkscapsel (d).

**Abbildung 14** Immunhistochemisch gefärbte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen in 50- und 200-facher Vergrößerung zur Detektion des Matrixproteins Col II in undifferenzierten Kontrollen (Kontrolle d27) und chondrogen differenzierten (Differenzierung d 27) Pellets aus Spongiosa (a), Hüftgelenkscapsel (b), LCF (c) und der Hüftgelenkscapsel (d).

**Abbildung 15** 50 und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop Aufnahmen zur Beurteilung der immunhistochemischen Col X-Färbung in Negativkontrollen (Kontrolle d 27) und chondrogen differenzierten MSC-Pellets (Differenzierung d 27) aus Spongiosa (a), Knorpelgewebe (b), dem LCF (c) und der anterioren Gelenkscapsel (d) des Hüftgelenks.

**Abbildung 16** Mittelwerte  $\pm$  SD (Fehlerbalken) der durch semiquantitative RT-PCR ermittelten Veränderungen der relativen Genexpression der chondrogenen Markergene AGG, Col II und Sox-9 in differenzierten Pellet-Kulturen aus Spongiosa, Knorpel, LCF und Kapsel in Relation zu den jeweiligen Negativkontrollen.

**Abbildung 17** Vergleich der immunhistochemischen Färbungen des Matrixmoleküls Col II (1-4), sowie der mittleren relativen Genexpression von Col II (5) in den chondrogen differenzierten Pellets aus Spongiosa (1, 5), Knorpel (2, 5), LCF (3, 5) und Gelenkscapsel (4, 5) im Vergleich zu den Negativkontrollen.

## TABELLENVERZEICHNIS

**Tabelle 1:** Tabelle zur Einstufung des ICRS-Score bei isolierten chondralen oder osteochondralen Läsionen des Gelenkknorpels (nach Brittberg, Evaluation of cartilage injuries and repair)

**Tabelle 2:** Verwendete Einwegmaterialien mit Herstellerangaben

**Tabelle 3:** Chemikalien mit Herstellerangaben

**Tabelle 4:** Zellkulturmedien und Zusätze zur Zellkultur mit Herstellerangaben

**Tabelle 5:** Immunhistochemische Antikörper mit Herstellerangaben und der zur Färbung eingesetzten Verdünnung

**Tabelle 6:** Antikörper für die Durchflusszytometrie mit Herstellerangaben und der Verdünnung in der diese geliefert wurde

**Tabelle 7:** Verwendete Enzyme mit Herstellerangaben

**Tabelle 8:** Primer mit Sequenzen, Annealing Temperatur, Produktgröße (bp), Zyklenzahl und eingesetzter  $MgCl_2$  Konzentration

**Tabelle 9:** Lösungsmittel und Reagenzpuffer

**Tabelle 10:** Verwendete Bausätze und Kits mit Herstellerangaben

**Tabelle 11:** Laborgeräte mit Herstellerangaben

**Tabelle 12:** Software mit Quellen- oder Herstellerangaben

## DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Andre Steinert für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas.

Ich danke außerdem herzlich Herrn Prof. Dr. med. Boris Michael Holzapfel für die spätere Übernahme der Leitung meiner Dissertation, sowie die zahlreichen wertvollen Ratschläge und Gespräche in und außerhalb des klinischen Alltags.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem langjährigen Mentor Dr. med. Manuel Weißenberger für seine intensive Betreuung während meiner Dissertation, für das Korrekturlesen meiner Promotionsarbeit, sowie die Förderung im klinischen Alltag. Ich danke Herrn Dr. med. Manuel Weißenberger außerdem für die bedingungslose Unterstützung in den Anfängen meiner klinischen Tätigkeit, sowie die Förderung und Hilfe während vieler Anschlussarbeiten. Ich weiß diese Form der Zusammenarbeit sehr zu schätzen und freue mich auf weitere gemeinsame Projekte in der Zukunft.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Fabian Gilbert sei vielmals für die Übernahme des Korreferates gedankt.

Außerdem bin ich dem Ärztlichen Direktor der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus, Herrn Prof. Dr. med. Maximilian Rudert, dafür dankbar, sowohl wissenschaftlich als auch klinisch am König-Ludwig-Haus tätig sein zu können.

Ein liebevoller Dank gilt meiner Freundin Diana Mattern für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Zudem danke ich herzlich Beate Geyer, dass sie mir bei der Aufarbeitung der molekularbiologischen und histologischen Ergebnisse stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Schließlich gilt ein besonderer Dank meinen Eltern. Vielen Dank für Euer Vertrauen und Eure bedingungslose Unterstützung in jeder erdenklichen Situation. Ihr seid meine Motivation und ohne Euch wäre nichts von alledem möglich.