

**Aus der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus**

**Lehrstuhl für Orthopädie**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert**

**Vergleichende in vitro-Charakterisierung des  
Differenzierungspotentials humaner mesenchymaler  
Stromazellen aus verschiedenen Geweben des Kniegelenkes von  
Patientinnen mit Gonarthrose.**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Konrad Felix Poker  
aus Schweinfurt**

**Würzburg, Februar 2023**

**Referent:** Prof. Dr. med. Andre Steinert

**Korreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

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

**Tag der mündlichen Prüfung:** 20.12.2022

**Der Promovend ist Arzt.**

**Meiner Familie gewidmet.**

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |                                      |
|------------------|--------------------------------------|
| Abb.             | Abbildung                            |
| ABC              | Avidin-Biotin-Complex                |
| ACI              | Autologe Chondrozyten Implantation   |
| AGN              | Aggrecan                             |
| Ak               | Antikörper                           |
| ALP              | Alkalische Phosphatase               |
| BMPs             | Bone morphogenetic proteins          |
| bp               | Basenpaare                           |
| BSA              | Bovines Serum Albumin                |
| BSP              | Bone sialoprotein                    |
| bzw.             | beziehungsweise                      |
| °C               | Grad Celsius                         |
| ca.              | circa                                |
| Ca <sup>2+</sup> | Calcium                              |
| CAD              | Computer assisted design             |
| CAM              | Computer assisted manufacturing      |
| CD               | Cluster of Differentiation           |
| cDNA             | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| cm <sup>2</sup>  | Quadratcentimeter                    |
| CO <sub>2</sub>  | Kohlenstoffdioxid                    |
| Col I            | Kollagen Typ I                       |
| Col II           | Kollagen Typ II                      |
| Col X            | Kollagen Typ X                       |
| COMP             | Cartilage oligomeric matrix protein  |
| d                | Tag                                  |
| dest.            | destilliert                          |
| DMEM             | Delbucco Eagle Modified Medium       |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid                     |
| dNTP             | Desoxynukleosidtriphosphate          |
| E                | Wellenlänge                          |

|                   |  |
|-------------------|--|
| EDTA              | Ethylendiamintetraacetat                               |
| EF1 $\alpha$      | Elongation factor 1 $\alpha$                           |
| et al.            | et altera  |
| EtOH              | Ethanol  |
| EZM               | Extrazelluläre Matrix                                  |
| FA                | Formaldehyd  |
| FACS              | Durchflusszytometrie                                   |
| FCS               | fetales Kälberserum                                    |
| g                 | Gramm  |
| g/L               | Gramm pro Liter  |
| x g               | mal Erdschwerebeschleunigung                           |
| GAGs              | Glykosamioglykane                                      |
| ggf.              | gegebenenfalls   |
| h                 | Stunde(n)  |
| HCl               | Salzsäure  |
| H&E               | Hämatoxylin-Eosin                                      |
| HLA               | Human Leukocyte Antigens                               |
| hMSCs             | humane mesenchymale Stomazellen                        |
| H <sub>2</sub> O  | Wasser   |
| HLPC              | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie               |
| IBMX              | 3-Isobutyl-1-Methylxanthin                             |
| ISCT              | International Society for Cellular Therapy             |
| ITS <sup>1+</sup> | Insulin-Transferrin-Selensäure                         |
| L                 | Litern   |
| LPL               | Lipoprotein Lipase                                     |
| MACI              | Matrix eingebettete autologe Chondrozyten Implantation |
| MDB               | Membrane Desalting Buffer                              |
| mind.             | mindestens   |
| Mg <sup>2+</sup>  | Magnesium  |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid                                       |
| min               | Minuten  |
| $\mu$ g/mL        | Mikrogramm pro Milliliter                              |

|               |   |
|---------------|---|
| µL            | Mikroliter  |
| mL            | Milliliter  |
| mM            | Millimol  |
| MMP           | Matrix Metallo-Peptidase                            |
| mRNA          | Messenger Ribonukleinsäure                          |
| MSC           | mesenchymale Stromazellen                           |
| mT            | Millitesla  |
| NaCl          | Natirumchlorid                                      |
| ng/mL         | Nanogramm pro Milliliter                            |
| nm            | Nanometer   |
| nM            | Nanomol   |
| OC            | Osteocalcin   |
| PBS           | Phosphate buffered Saline                           |
| PBST          | PBS-Tween   |
| PFA           | Paraformaldehyd                                     |
| PPAR $\gamma$ | Peroxisome Proliforator-activated Receptor $\gamma$ |
| rpm           | Umdrehungen pro Minute                              |
| RT            | Raumtemperatur                                      |
| RT-PCR        | reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion     |
| RUNX-2        | Runt-related transcription factor-2                 |
| s             | Sekunden  |
| SD            | Standardabweichung                                  |
| SOX-9         | SRY-related high mobility group box-9               |
| Tab.          | Tabelle   |
| TBE           | TRIS-Borat-EDTA-Puffer                              |
| TEP           | Totale Endoprothese                                 |
| TGF- $\beta$  | Transforming growth factor- $\beta$                 |
| U/mL          | Einheiten pro Milliliter                            |
| V             | Volt  |
| VKB           | vorderes Kreuzband                                  |
| z.B.          | zum Beispiel  |

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <i>1.1 Hyaliner Gelenkknorpel und die Rolle der mesenchymalen Stromazellen</i>                | <i>1</i>  |
| <i>1.1.1 Aufbau des Gelenkknorpels und aktuelle therapeutische Möglichkeiten bei Arthrose</i> | <i>1</i>  |
| <i>1.1.2 Definition von mesenchymale Stammzellen</i>  | <i>4</i>  |
| <i>1.2 Wachstumsfaktoren in der Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen</i>            | <i>5</i>  |
| <i>1.2.1 Faktoren der adipogenen Differenzierung</i>  | <i>5</i>  |
| <i>1.2.2 Faktoren der osteogenen Differenzierung</i>  | <i>6</i>  |
| <i>1.2.3 Faktoren der chondrogenen Differenzierung</i>  | <i>6</i>  |
| <b>2. Zielsetzung</b>   | <b>8</b>  |
| <b>3. Material und Methoden</b>   | <b>9</b>  |
| <i>3.1 Material</i>   | <i>9</i>  |
| <i>3.1.1 Verbrauchsmaterialien</i>  | <i>9</i>  |
| <i>3.1.2 Chemikalien und Reagenzien</i>   | <i>11</i> |
| <i>3.1.3 Zellkulturmedien und -zusätze</i>  | <i>13</i> |
| <i>3.1.4 Antikörper</i>   | <i>15</i> |
| <i>3.1.5 Enzyme</i>   | <i>15</i> |
| <i>3.1.6 Primer</i>   | <i>16</i> |
| <i>3.1.7 Puffer- und andere Lösungen</i>  | <i>17</i> |
| <i>3.1.8 Bausätze und Kits</i>  | <i>19</i> |
| <i>3.1.9 Laborgeräte</i>  | <i>20</i> |
| <i>3.1.10 Software</i>  | <i>22</i> |
| <i>3.2 Methoden</i>   | <i>23</i> |
| <i>3.2.1 Isolieren und kultivieren von hMSCs</i>  | <i>23</i> |
| <i>3.2.1.1. Isolierung von hMSCs aus Nativgewebe</i>  | <i>23</i> |
| <i>3.2.1.2 Ablösen und Kryokonservierung der hMSCs</i>  | <i>26</i> |
| <i>3.2.2 Differenzierung von hMSCs</i>  | <i>27</i> |
| <i>3.2.2.1 Monolayer Kulturen für die adipogene und osteogene Differenzierung</i>             | <i>27</i> |
| <i>3.2.2.1.1 Adipogene Differenzierung</i>  | <i>28</i> |
| <i>3.2.2.1.2 Osteogene Differenzierung</i>  | <i>29</i> |
| <i>3.2.2.2 Pellet-Zellkulturen für die chondrogene Differenzierung</i>                        | <i>30</i> |
| <i>3.2.2.1 Chondrogene Differenzierung</i>  | <i>31</i> |
| <i>3.2.3 Histologische Untersuchungen</i>   | <i>31</i> |
| <i>3.2.3.1 Silanisierung von Objektträgern</i>  | <i>31</i> |
| <i>3.2.3.2 Fixieren und Einbetten der nativen Gewebeproben in Paraffin</i>                    | <i>32</i> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.2.3.3    | <i>Schneiden und Entparaffinieren der nativen Gewebsproben</i>  | 34        |
| 3.2.3.4    | <i>Hämatoxylin-Eosin Färbung</i>  | 34        |
| 3.2.3.5    | <i>Oil RedO - Färbung</i>   | 36        |
| 3.2.3.6    | <i>Alizarin Red S - Färbung</i>   | 37        |
| 3.2.3.7    | <i>Kryokonservierung der Pellet - Zellkulturen</i>  | 38        |
| 3.2.3.8    | <i>Erstellen von Kryoschnitten der Pellets</i>  | 38        |
| 3.2.3.9    | <i>Alcian Blau-Färbung</i>  | 39        |
| 3.2.3.10   | <i>Immunhistologie</i>  | 40        |
| 3.2.3.10.1 | <i>Kollagen Typ II Färbung</i>  | 42        |
| 3.2.3.10.2 | <i>Kollagen Typ X Färbung</i>   | 42        |
| 3.2.4      | <i>Molekularbiologische Untersuchungen</i>  | 42        |
| 3.2.4.1    | <i>Isolation des hMSC - Lysats</i>  | 42        |
| 3.2.4.1.1  | <i>Lysieren der Monolayer-Zellkulturen</i>  | 43        |
| 3.2.4.1.2  | <i>Lysieren der Pellet-Zellkulturen</i>   | 43        |
| 3.2.4.2    | <i>RNA-Isolation und Aufreinigung</i>   | 43        |
| 3.2.4.3    | <i>cDNA-Synthese</i>  | 45        |
| 3.2.4.4    | <i>Semiquantitative RT-PCR</i>  | 46        |
| 3.2.4.5    | <i>Agarose-Gelelektrophorese</i>  | 47        |
| 3.3        | <i>FACS-Analyse</i>   | 47        |
| 3.4        | <i>Statistische Auswertung</i>  | 48        |
| <b>4.</b>  | <b>Ergebnisse</b>   | <b>50</b> |
| 4.1        | <i>Isolation und Kultivierung der mesenchymalen Stromazellen aus den nativen Geweben des Kniegelenkes</i> | 50        |
| 4.1.1      | <i>Hämatoxylin-Eosin Färbung der Nativgewebe</i>  | 50        |
| 4.1.2      | <i>Wachstum und Morphologie der isolierten hMSCs</i>  | 52        |
| 4.1.3      | <i>FACS-Analyse</i>   | 52        |
| 4.2        | <i>Adipogene Differenzierung</i>  | 56        |
| 4.2.1      | <i>Unterschiede der einzelnen Gewebe im Rahmen der adipogenen Differenzierung</i>                         | 56        |
| 4.2.2      | <i>Oil - RedO Färbung</i>   | 59        |
| 4.2.3      | <i>Semiquantitative PCR - Analyse von adipogenen Markergenen</i>  | 61        |
| 4.3        | <i>Osteogene Differenzierung</i>  | 64        |
| 4.3.1      | <i>Unterschiede der einzelnen Gewebe im Rahmen der osteogenen Differenzierung</i>                         | 64        |
| 4.3.2      | <i>Alizarin Rot S Färbung von Monolayerkulturen</i>   | 68        |
| 4.3.3      | <i>Semiquantitative PCR - Analyse von osteogenen Markergenen</i>  | 70        |
| 4.4        | <i>Chondrogene Differenzierung</i>  | 73        |
| 4.4.1      | <i>Chondrogenen Differenzierung in Pelletkulturen</i>   | 73        |
| 4.4.2      | <i>Alcian - Blau Färbung der Pelletkulturen</i>   | 74        |



|  |            |
|--|------------|
| <i>4.4.3 Immunhistochemische Färbung der chondrogenen Markergene Kollagen Ila1 und Kollagen X</i>                    | 76         |
| <i>4.4.4 Semiquantitative PCR - Analyse von chondrogenen Markergenen</i>   | 79         |
| <b>5. Diskussion</b>   | <b>83</b>  |
| <i>5.1 Diskussion von Material und Methoden</i>  | 83         |
| <i>5.1.1 Verwendung von primären humanen Zellen vs Zellkulturlinien</i>  | 83         |
| <i>5.1.2 Pelletkulturen versus andere dreidimensionale Kulturverfahren für die chondrogene Differenzierungsreihe</i> | 83         |
| <i>5.1.3 Verwendung von Wachstumsfaktoren versus Gentransfer</i>   | 84         |
| <i>5.1.4 Diskussion der Analysetechniken</i>   | 85         |
| <i>5.2 Diskussion der Ergebnisse</i>   | 87         |
| <i>5.2.1 Diskussion von Zellcharakteristika</i>  | 87         |
| <i>5.2.2 Adipogene Differenzierung der sechs verschiedenen Gewebe</i>  | 88         |
| <i>5.2.3 Osteogene Differenzierung der sechs verschiedenen Gewebe</i>  | 89         |
| <i>5.2.4 Chondrogene Differenzierung der sechs verschiedenen Gewebe</i>  | 90         |
| <i>5.2.5 Vergleich des Differenzierungspotentials der einzelnen Gewebe</i>   | 92         |
| <i>5.3 Vergleich mit anderen Studien zur Knorpelregeneration mit MSCs</i>  | 94         |
| <b>6. Zusammenfassung</b>  | <b>98</b>  |
| <b>7. Bibliografie</b>   | <b>100</b> |
| <b>8. Tabellenverzeichnis</b>  |            |
| <b>9. Abbildungsverzeichnis</b>  |            |

**Danksagung**

**Lebenslauf**

# **1. Einleitung**

## **1.1 Hyaliner Gelenkknorpel und das Potential mesenchymaler Stromazellen bei der Knorpelregeneration**

### **1.1.1 Aufbau des Gelenkknorpels und aktuelle therapeutische Möglichkeiten bei Arthrose**

Hyalines Knorpelgewebe hat eine außergewöhnlich komplexe Struktur, bestehend aus Chondrozyten eingebettet in einer, hauptsächlich bestehend aus Proteoglykanen und Wasser bestehenden extrazellulären Matrix. Diese Struktur erlaubt es dem Knorpelgewebe große Beanspruchung und Belastungen auszuhalten [1]. Daher eignet er sich hervorragend zur Kraftabfederung an den Gelenkflächen. Allerdings weisen die Chondrozyten auch ein recht limitiertes Regenerationspotential auf [1-3]. Dieses beruht darauf, dass das Knorpelgewebe keine eigene direkte Blutzirkulation in allen Schichten hat, sondern die meisten Anteile des Gewebes über Diffusion aus den angrenzenden Geweben [4], der Synovialflüssigkeit [5, 6] und den umliegenden Kapillaren ernährt werden. Des Weiteren ist adultes Knorpelgewebe, im Gegensatz zu vielen anderen Geweben des menschlichen Körpers, sehr immobil und weist kein ausgeprägtes Proliferationspotential auf, weswegen es sich auch nur schlecht von einer Verletzung erholen kann. Daraus resultierend stellen traumatische, aber auch nicht traumatische Knorpelschäden, wie sie zum Beispiel auf Grund von Osteoarthritis oder der Osteochondrosis dissecans entstehen können, bis heute eine besondere Herausforderung in der medizinischen Versorgung dar. Insbesondere die Osteoarthritis stellt mit einer weltweiten Prävalenz von 15% eine massive Einschränkung für die soziale Aktivität der Patienten und auf Grund der eingeschränkten Arbeitsfähigkeit, sowie der Versorgungskosten, ein großes gesundheitsökonomisches Problem

dar [7-9]. Die extrazelluläre Matrix (EZM) des hyalinen Gelenkknorpels besteht zu einem Großteil aus Proteoglykanen, insbesondere Aggrecan, Kollagenfasern und nicht-kollagenösen Proteinen. Bei den Kollagenfasern handelt es sich dabei hauptsächlich um Fasern des Kollagentyp II (Col II) [1]. Im Gegensatz zu den Typ I Fasern, welche vor allem im Knochengewebe vorkommen, sorgen diese Fasern, vor allem im Zusammenspiel mit Proteoglykanen, wahrscheinlich für die hohe Wasserspeicherkapazität und ermöglichen dadurch die Elastizität des Knorpels, welche für die hohe Belastbarkeit des Gewebes benötigt wird. Erreicht ein Defekt die subchondralen Schichten, gewinnt er einen Anschluss an die Blutversorgung des Knochengewebes. Dadurch können dann auch Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel der Platelet-derived growth factor, sowie Transforming growth factor (TGF) -  $\beta$  eingeschwemmt werden und eine Regeneration des Knorpelgewebes bedingen. Diese Tatsache wird sich auch in dem Therapieansatz der Mikrofrakturierung oder der Abrasionsplastik zum Vorteil gemacht. Allerdings kommt es bei den Regenerationsprozessen nur zur Ausbildung eines minderwertigen Ersatzes aus Faserknorpel, welcher nicht die hohen biomechanischen Ansprüche an das ursprüngliche Knorpelgewebe leisten kann, da er im Gegensatz zu gesundem Knorpelgewebe einen hohen Anteil von Kollagen I (Col I) Fasern und einen uneinheitlichen Anteil von Col II Fasern aufweist [2, 10-14]. Auf Grund dessen kommt es im Laufe der Zeit daher meist wieder zu einem Abbau dieses Ersatzgewebes, einhergehend mit den klinischen Arthrosebeschwerden der betroffenen Patienten, welche dann weitere Maßnahmen erforderlich machen [4]. Weitere Therapieansätze stützen sich auf das Einbringen von Zellen, beziehungsweise zellreichen Geweben in das Defektareal. Die autologe Chondrozyten Implantation (ACI), beziehungsweise ihre Weiterentwicklung, die in Matrix eingebettete autologe Chondrozyten Implantation (MACI), weisen hierbei gute klinische Ergebnisse vor und haben eine 10 Jahres Erfolgsquote, ohne Auftreten von Komplikationen, von bis zu ungefähr 80% [2, 15]. Allerdings kommt es auch bei dieser operativen Technik nur zur Ausbildung von hyalin-ähnlichen Strukturen und zu Komplikationen, wie Abstoßungsreaktionen, dem Verlust des Phänotyps der Zellen sowie früher

auch der Periostlappchenhypertrophie, welche heute nicht mehr verwendet werden [16-18]. Des Weiteren zeigt die Verwendung von charakterisierten Chondrozyten, welche nach der Expression eines bestimmten Genprofils selektiert wurden, einen möglichen Vorteil gegenüber der Benutzung von unselektierten Chondrozyten und ein besseres Ergebnis in der Ausbildung hyalin-ähnlichen Knorpels, gegenüber der Resultate der klassischen Mikrofrakturierung [19]. Neuere Therapieansätze entstehen zum Teil auf Basis von mesenchymalen Stromazellen (MSCs). Das Potential der MSC besteht darin, dass sie ein pluripotentes Differenzierungspotential aufzeigen und somit, durch die Hilfe verschiedener Stimuli, in Zellen der verschiedenen Zellgewebe differenziert werden können. Bereits jetzt gibt es erste Therapieversuche mit Hilfe von MSCs, welche aus der Spongiosa, Adipozyten oder der Synovialmembran gewonnen wurden und nach chondrogener Differenzierung auf einem Trägermedium zur Defektdeckung genutzt werden. Dabei ist die Ausbildung einer dem hyalinen Knorpel ähnlichen Struktur zu erkennen. Allerdings zeigt die Forschung bis zum jetzigen Zeitpunkt auch, dass die chondrogen differenzierten Zellen zur Hypertrophie neigen, welches durch die Expression von Kollagentyp X (Col X) nachgewiesen werden kann [20]. Wie bereits gezeigt werden konnte, haben MSCs auch einen immunmodulatorischen Effekt, welcher ihren Einsatz besonders interessant macht, da sich dadurch potentiell Komplikationen wie die Graft - versus - Host - Disease umgehen lassen könnten [21, 22]. Ein weiterer Immunmodulierender Effekt ist die parakrine Exkretion von Molekülen, welche die lokalen Immunreaktionen beeinflussen können. Unter anderem erfolgt die Exkretion von TGF- $\beta$  [23, 24], welches auch einen Wachstumsfaktor in der chondrogenen Differenzierung darstellt.

Für diese Doktorarbeit wurden humane mesenchymale Stromazellen (hMSCs) aus sechs verschiedenen Geweben des Kniegelenkes gewonnen. Es handelt sich bei den Geweben um Spongiosa des Femurs, Knorpel, das vordere Kreuzband, die Menisken, die Synovialmembran und den Hoffa-Fettkörper. Bereits bekannt durch mehrere andere Arbeiten ist das Vorkommen von hMSCs unter anderem im Knochen [25-30], im Knorpel [31, 32], in der Synovialmembran

[33, 34], in den Menisken [35] und im Fettgewebe, wie dem Hoffa-Fettkörper [36-39]. Auch konnten bereits im vorderen Kreuzband hMSCs nachgewiesen werden [40-42]. Die aus diesen Geweben isolierten Zellen wurden für diese Arbeit mit Hilfe von verschiedenen Medien adipogen, osteogen, sowie chondrogen differenziert und anschließend histologisch und molekularbiologisch aufgearbeitet, um zu Vergleichen, was für Unterschiede die differenzierten Zellen der einzelnen Gewebe aufweisen. Als Spender wurden weibliche Patientinnen unter 60 Jahren rekrutiert, welche, auf Grund von Arthrosebeschwerden, eine totale Knieendoprothese (Knie-TEP) bekamen. Diese Spenderinnen wurden ausgewählt, um evaluieren zu können, wie sich die Gewebe bei Arthrosepatientinnen verhalten und welche Gewebe sich für einen eventuellen Therapieansatz unter Verwendung von autologen hMSCs eignen würden.

### **1.1.2 Definition von mesenchymalen Stromazellen**

Bei den MSC handelt es sich um multipotente, fibroblastische [29, 42, 43] Zellen, welche das Potential besitzen, sich in verschiedene Gewebe, wie zum Beispiel Knochen, Knorpel, Fett [25, 43-52], Nerven [53-55] und Muskeln [49, 52] zu differenzieren. Die erste Beschreibung dieser Zellen aus dem Knochenmark erfolgte bereits 1970 durch *Friedenstein et al.* [25, 42]. Dabei ist insbesondere die Gewinnung der Zellen aus dem Knochenmark und aus Fettgewebe vergleichsweise gängig und viel genutzt [56]. Um die Definition der MSCs in der Forschung zu vereinheitlichen, wurden von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) Kriterien erstellt. Die drei Hauptkriterien, welche die Zellen dabei erfüllen müssen, sind: Plastikadhärenz in Kulturflaschen unter Standardbedingungen, ein spezifisches Muster an Oberflächenantigenen, sowie die Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung. Insbesondere die chondrogene, osteogene und adipogene Differenzierbarkeit muss dabei gewährleistet sein.

Des Weiteren sollten mindestens 95% der Zellen die Marker Cluster of Differentiation (CD)105, CD73 und CD90 aufweisen, während gleichzeitig weniger als 2% die hämatopoetischen Markergene CD11b oder CD14, CD 34, CD45, CD79 $\alpha$  oder CD19 und HLA-Klasse-II-Antigene exprimieren dürfen [57]. *Ramos et al.* konnten weiterhin CD 44 als einen wichtigen Marker für hMSCs etablieren [58].

## **1.2 Wachstumsfaktoren für die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen**

### **1.2.1 Faktoren der adipogenen Differenzierung**

Im Rahmen der adipogenen Differenzierung von hMSCs spielen unter anderem Insulin, Glukokortikoide, wie beispielsweise Dexamethason, 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) und Indomethacin als Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle. Insulin reguliert dabei die adipogene Differenzierung von Zellen und deren Lipideinlagerung [59]. Dexamethason, ein Kortikosteroid, und IBMX induzieren die Genexpression von CCAAT/enhancer binding proteins  $\beta$  and  $\delta$ , welche Transkriptionsfaktoren der adipogenen Differenzierung darstellen [60]. Indomethacin, welches ein nicht-steroidales Anti-Rheumatikum ist, bindet bei Preadipocyten unter anderem an den Peroxisome Proliforator-activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) und aktiviert diesen. PPAR $\gamma$  ist ein Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor, welcher spezifisch in Adipozyten vorkommt und als Regulator der adipogenen Differenzierung dient [61].

### **1.2.2 Faktoren der osteogenen Differenzierung**

Bei der osteogenen Differenzierung von hMSCs spielen die Faktoren Glukokortikoide,  $\beta$ -Glycerophosphat und L-Ascorbat eine wichtige Rolle. Durch das Glukokortikoid wird in der Zelle die Transkription des Runx-related transcription factor-2 (RUNX-2) bewirkt [62, 63]. Dieser hat Auswirkung auf die Expression von Knochen-spezifischen Genen wie beispielsweise Osterix, Col I, Osteocalcin und bone sialoprotein (BSP) [64]. Zur Ausbildung der EZM brauchen die osteogen differenzierenden Zellen die Ionen Calcium und Phosphat. Dabei dient  $\beta$ -Glycerophosphat als Quelle für das ionisierte Phosphat und sorgt somit unter anderen für die Mineralisierung der EZM, sowie für eine Steigerung der Protein- und Phospholipidsynthese, welche eine verstärkte osteogene Differenzierung indizieren [65]. Ascorbinsäure dient bei der Entwicklung vor allem als Cofaktor im Rahmen der Kollagensynthese, welchen einen großen Anteil der EZM ausmachen [64, 66, 67].

### **1.2.3 Faktoren der chondrogenen Differenzierung**

Damit MSCs in-vitro chondrogen differenzieren können, brauchen die Zellen bestimmte Voraussetzungen. Diese beschrieb *Johnstone et al.* bereits 1998 [68] und definierte dabei die zwei Hauptfaktoren, enger Zell-Zell-Kontakt, erreichbar beispielsweise durch die Verwendung von Pellet-Zellkulturen [68], sowie die Zugabe von chondrogenen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Dexamethason, als Glukokortikoid, Ascorbinsäure und Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  [68], welche sich dabei in Studien als besonders effektiv erwiesen haben [69-73].

Wie auch bei der osteogenen Differenzierung, dient Ascorbinsäure dabei im Rahmen der Kollagensynthese als Cofaktor und verstärkt die Entwicklung der

Col II Fasern, welche ein wichtiger Bestandteil der chondrogenen EZM ausmachen [72]. Glukokortikoide sorgen in Kombination mit TGF- $\beta$  für einen chondrogenen Differenzierungsreiz der MSCs. In der Kombination sorgen Glukokortikoide für eine Hochregulation der Transkription von chondrogenen Matrixproteinen, wie beispielsweise Aggrecan, Col II und cartilage oligomeric matrix protein (COMP) [64]. Die TGF- $\beta$  Superfamilie, welche eine Gruppe von Polypeptiden beschreibt, zu denen neben TGF- $\beta$  auch die Inhibine, Activine und die B(one) M(orphogenic) P(roteins) gehören, hat einen großen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung von MSCs. Dabei hat sich gezeigt, dass TGF- $\beta$  und BMPs den größten Einfluss auf die chondrogene Differenzierung haben [74]. So ist bekannt, dass die Entwicklung der Stromazellen zu den chondrogenen Progenitorzellen durch die Anwesenheit von TGF- $\beta$  angestoßen wird. Durch diesen Anstoß wird die Synthese von, unter anderem, Firbonectin, Tenascin und Syndecan [75] angeregt. Dies wiederum ermöglicht die Kondensation und anschließende Differenzierung der MSCs zu sogenannten Prechondrozyten, welche anschließend beginnen Kollagen zu exprimieren und die Synthese von Glukosaminoglykanen (GAGs) und Cadherin induziert [76].



## **2. Zielsetzung**

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, zeigen vorherige Studien, dass hMSCs aus den verschiedenen Geweben des Kniegelenkes isoliert werden können. Diese Studien fokussieren sich dabei zumeist auf ein einzelnes Gewebe, welches innerhalb der selbigen untersucht wurde. Ziel dieser Arbeit ist es daher nun die Isolation von hMSCs aus sechs verschiedenen Geweben des Kniegelenkes zu verifizieren und dabei einen Vergleich der verschiedenen Gewebe bezogen auf einen einzelnen Spender zu erstellen. Dies bietet die Möglichkeit die Unterschiede der Differenzierungspotentiale der Gewebe zu vergleichen, da die Spendervariabilität dabei eliminiert wird. Hierdurch kann betrachtet werden, welches der Gewebe im Vergleich das vielversprechendste Potential für eine Anpassung von Therapiemöglichkeiten im Sinne des Knorpelersatzes mittels körpereigener hMSCs aufweist.

Als Spenderkollektiv wurden fünf Patientinnen mit Gonarthrose unter 60 Jahren ausgewählt, welche allesamt zuvor der Entnahme des Materials schriftlich zustimmten. Zur Untersuchung wurden für diese Arbeit Teile des spongiösen Knochens, des Knorpels, die Menisken, das vordere Kreuzband, die Synovialmembran sowie der Hoffa'sche Fettkörper bei der operativen Versorgung der Probandinnen mittels Knie-TEP entnommen und untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

|  |   |
|--|---|
| Objektträger-Deckplatten 24 x 50 mm                            | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                                    |
| Objektträger 24 x 50 mm  | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                                    |
| SuperFrost® Objektträger                                       | Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland                          |
| Einmal-Skalpelle   | Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland                                 |
| Einmalhandschuhe, unsteril                                     | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland                               |
| Einmalhandschuhe, steril                                       | Ansell Health Care, Anderlecht, Belgien                                       |
| Zellkulturplatten (6 well)                                     | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland                              |
| Plastikpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)                           | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland                              |
| Zellschaber  | Biologix Europe GmbH, Niederzier, Deutschland                                 |
| 20-Gauge-Mikrolanzette   | Becton Dickinson GmbH, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Photometer-Küvetten  | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  |
| Reaktionsgefäße (1,5 mL)                                       | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland                              |
| Spritzen (20 mL, 2 mL)   | Becton Dickinson GmbH, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Zellsieb (70 µm)   | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland                              |
| Spritzenfilter (0,20 µm)                                       | Biotech GmbH, Wiesbaden, Deutschland  |
| Kryo-Gefäße (2 mL)   | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland                              |
| Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> ) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland                              |

|   |  |
|---|--|
| Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)                | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland               |
| Wiegeschalen                                      | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                     |
| Einbettkassetten                                  | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                     |
| 2 Well Chamber Slides                             | Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland           |
| Pasteurpipetten                                   | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                     |
| Petrischalen                                      | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland               |
| Pipettenspitzen (0,5-20 µL, 2-200 µL, 50-1000 µL) | Brandt, gekauft bei Laug & Scheller GmbH, Kürnach, 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               |
| PCR-Reaktionsgefäße                               | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland        |
| Mikrotomklingen Paraffinschnitte                  | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                     |
| Stahlmesser für Gefrierschnitte                   | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland         |
| Tissue-Tek® (Cryomold Standard)                   | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                     |
| Faltenfilter                                      | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                     |

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangabe

|  |   |
|--|---|
| Aceton   | · AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Alcian Blau  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland                 |
| Alizarin Red S   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland                 |
| Antikörper-Verdünnungspuffer   | DCS, Hamburg, Deutschland   |
| Borsäure   | ·   |
| β-Mercaptoethanol  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland                     |
| β-Glycerophosphat  | ·   |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland   |
| dNTP-Mix   | Bioloin GmbH, Luckenwalde, Deutschland                              |
| Dulbecco's Phosphat-gepuffertes <sup>2+</sup> Pulversalz w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg (PBS) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland                                    |
| Entellan (eindecken)   | · Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                                |
| Eosin  | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                                  |
| Essigsäure   | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland        |
| Ethanol  | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland        |
| Ethanol (denaturiert)  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland                     |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Tetranatriumsalz  | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland        |
| GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000x  | Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland                          |
| Hämatoxylin HPLC-Wasser ITS-plus   | Sigma-Adrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland                  |
| Kernechtrot L-Ascorbatsäure-2-Phosphat, Sesquimagnesiumsalz                                | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland                     |
| LE Agarose   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland                 |
| Dexamethason   | · Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                                |

|   |  |
|---|--|
| 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)                             | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf, Deutschland               |
| Natriumpyruvat  | Biozym Scientific GmbH, Hessisch<br>Oldendorf, Deutschland           |
| L-Prolin, non animal source                                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf, Deutschland               |
| Insulin from bovine pancreas                                  | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein<br>GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Mausserum   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf, Deutschland               |
| Methanol  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf, Deutschland               |
| Natriumchlorid  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Schnelldorf, Deutschland               |
| Natriumhydroxidlösung   | PAA Laboratories GmbH, Pasching,<br>Österreich                       |
| Natriumiodid Oil RedO   | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein<br>GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Paraffin  | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein<br>GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Paraformaldehyd   | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein<br>GmbH, Würzburg, Deutschland |
| PBS Delbucco mit $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$          | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                                   |
| 2-Propanol  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,<br>Deutschland                   |
| Random Hexamere Salzsäure                                     | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein<br>GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                                    | PAA Laboratories GmbH, Pasching,<br>Österreich                       |
| 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-<br>diol THAM (Trisbase) | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein<br>GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Trypanblau  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,<br>Deutschland                   |
| Tween 20  | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein<br>GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Xylol   | Applichem, gekauft bei A. Hartenstein<br>GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Xylol   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,<br>Deutschland                   |
| Zitronensäure   | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland                                   |

### 3.1.3 Zellkulturmedien und -zusätze

Tab. 3: Zellkulturmedien und -zusätze mit Herstellerangabe

|  |  |
|--|--|
| Medien für die Zellkultur:                   |  |
| DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin               | Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland   |
| DMEM/High Glucose mit L-Glutamin             | Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland   |
| Fetales Kälberserum (FCS)                    | Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland   |
| Penicillin/Streptomycin (100x)               | Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland   |
| Zellkulturzusätze:                           |  |
| L-Ascorbatsäure-2-Phosphat (50 mg/mL)        | In destilliertem Wasser verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert  |
| Dexamethason (1 mM)                          | In Ethanol verdünnt, aliquotiert bei -80°C gelagert  |
| β-Glycerophosphat, Dinatriumsalzhydrat (1 M) | In destilliertem Wasser verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert  |
| 3-Isobutyl-1-methylxantin (IBMX) (500 mM)    | In DMSO verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert  |
| Insulin vom Rinderpankreas (2 mg/mL)         | In Essigsäure und destilliertem Wasser gelöst, 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 destilliertem Wasser verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert  |
| L-Prolin (40 mg/mL)                          | In destilliertem Wasser verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert  |
| TGF-β1 (10 µg/mL)                            | In destilliertem Wasser verdünnen, in Puffer aus Albumin und 1x PBS lösen, steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert |
| IST+1 Liquid Media Supplement (100x)         | In destilliertem Wasser verdünnt, steril filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert  |
| Medien zur Kultivierung und Differenzierung: |  |

|   |  |
|---|--|
| Adipogenes Differenzierungsmedium           | DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 10% FCS<br>100 U/mL Penicillin<br>100 µg/mL Streptomycin<br>1 µM Dexamethason 500 µM IBMX<br>1 µg/mL Insulin<br>100 µM Indomethacin  |
| Chondrogenes Differenzierungsmedium         | DMEM/High Glucose (4,5 g/L)<br>100 U/mL Penicillin<br>100 µg/mL Streptomycin<br>50 µg/mL L-Ascorbinsäure-2-Phosphat<br>100 nM Dexamethason<br>100 µg/mL Pyruvat 40 µg/mL L-Prolin 1%<br>ITS+1 10ng/mL TGF-β1 |
| Osteogenes Differenzierungsmedium           | DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 10% FCS<br>100 U/mL Penicillin<br>100 µg/mL Streptomycin<br>50 µg/mL L-Ascorbinsäure-2-Phosphat<br>10 mM β-Glycerophosphat<br>100 nM Dexamethason                                |
| Osteogenes und Adipogenes<br>Kontrollmedium | DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 100 U/mL<br>Penicillin<br>100 µg/mL Streptomycin   |
| Chondrogenes Kontrollmedium                 | DMEM/High Glucose (4,5 g/L)<br>100 U/mL Penicillin<br>100 µg/mL Streptomycin<br>50 µg/mL L-Ascorbinsäure-2-Phosphat  |

### 3.1.4 Antikörper

Tab. 4: Antikörper zur Charakterisierung des Phänotyps der hMSCs

| Antigen                       | Hersteller  | Verdünnung |
|-------------------------------|---|------------|
| FACS-Analyse:                 |   |            |
| CD73 PerCP-eFluor710          | Thermo Fisher Scientific GmbH,<br>Dreieich, Deutschland | 5 µL/Test  |
| CD44 eFluor 450               | Thermo Fisher Scientific GmbH,<br>Dreieich, Deutschland | 0,2 mg/mL  |
| CD105 APC                     | Thermo Fisher Scientific GmbH,<br>Dreieich, Deutschland | 5 µL/Test  |
| CD90 FITC                     | Thermo Fisher Scientific GmbH,<br>Dreieich, Deutschland | 5 µL/Test  |
| Chondrogene Immunhistochemie: |   |            |
| Col II $\alpha$ 1             | Acris Antibodies GmbH, Herford,<br>Deutschland          | 5 µg/mL    |
| Col X                         | Abcam pls, Cambridge,<br>Großbritannien                 | 5 µg/mL    |

### 3.1.5 Enzyme

Tab. 5: Enzyme mit Herstellerangabe

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Promega® Reverse Transkriptase  | Promega GmbH, Mannheim, Deutschland            |
| Collagenase NB4                 | Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland |
| Promega® GoTaq Polymerase       | Promega GmbH, Mannheim, Deutschland            |
| 2,5% Trypsin (10x konzentriert) | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich    |



### 3.1.6 Primer

Die hier angewendeten Primer waren bereits alle im wissenschaftlichen Labor des König- Ludwig-Hauses etabliert. Zur Vermeidung von falsch positiven Nachweisen durch DANN-Verunreinigungen in den RNA-Proben wurde diese, wenn möglich, so hergestellt, dass sie verschiedene Exons überspannen.

Tab. 6: Primersequenzen mit Anneal. Temp. (Annealing Temperatur), Produktgröße (bp) und Zyklenzahl

LPL = Lipoprotein Lipase; PPAR $\gamma$ 2 = Proliferator-activating receptor gamma 2; AGN = Aggrecan core protein (Aggrecan); ALP = Alkalische Phosphatase; Col I= KollagenTyp I; Col II= KollagenTyp II; Col X= KollagenTyp X; OC = Osteocalcin; SOX-9 = SRY (sex determining region y) -box-9; EF1 $\alpha$  = Elongation factor 1 $\alpha$

| Gen                                     | Primersequenz (5'-3')   | Anneal. Temp. (°C) | Produkt-größe (bp) | Zyklus-zahl |
|---|---|--------------------|--------------------|-------------|
| <b>Adipogene Marker</b>                 |   |                    |                    |             |
| LPL                                     | Sense: GAGATTTCTCTGTATGGCACC<br>Antisense: CTGCAAATGAGACACTTTTCTC     | 51.0               | 250                | 30          |
| PPAR $\gamma$ 2                         | Sense: GCTGTTATGGGTGAAACTCTG<br>Antisense: ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC      | 61.0               | 380                | 35          |
| <b>Chondrogene Marker</b>               |   |                    |                    |             |
| Col II                                  | Sense: TTTCCCAGGTCAAGATGGTC<br>Antisense: CTTCAGCACCTGTCCACCA         | 58.0               | 374                | 35          |
| AGN                                     | Sense: TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC<br>Antisense: GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA  | 54.0               | 392                | 30          |
| SOX-9                                   | Sense: ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG<br>Antisense: TCAGAAGTCTCCAGAGCTTG        | 58.0               | 263                | 35          |
| <b>Hypertrophe und osteogene Marker</b> |   |                    |                    |             |
| Col X                                   | Sense: CCCTTTTTGCTGCTAGTATCC<br>Antisense: CTGTTGTCCAGGTTTTCTGGCAC    | 54.0               | 468                | 25          |
| Col I                                   | Sense: GGACACAATGGATTGCAAGG<br>Antisense: TAACCACTGCTCCACTCTGG        | 54.0               | 461                | 32          |
| OC                                      | Sense: ATGAGAGCCCTCACACTCCTC<br>Antisense: GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC      | 59.0               | 387                | 35          |
| ALP                                     | Sense: TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA<br>Antisense: TCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC | 51.0               | 454                | 35          |
| <b>Interne Kontrolle</b>                |   |                    |                    |             |
| EF1 $\alpha$                            | Sense: AGGTGATTATCCTGAACCATCC<br>Antisense: AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC    | 54.0               | 234                | 25          |

### 3.1.7 Puffer und andere Lösungen

Tab. 7: Lösungen mit Inhaltsstoffen

| Lösungen für die Zellkultur und Differenzierung: |  |
|--|--|
| 1,25 U/mL Collagenase                            | in PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup><br>steril filtriert und aliquotiert bei -20°C<br>gelagert   |
| 1x PBS <sup>-</sup>                              | 9,55 g PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup><br>gelöst in 1000 mL Aqua bidest.<br>pH der Lösung auf 7,4 einstellen  |
| 1x PBS/EDTA                                      | 9,55 g PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup><br>0,2 g EDTA-Tetranatriumsalzhydrat gelöst<br>in 1000 mL Aqua bidest.<br>pH der Lösung auf 7,4 einstellen   |
| Lösungen für Molekularbiologie:                  |  |
| 2% Paraformaldehyd-Lösung                        | 2 g Paraformaldehyd in 75 mL 1x PBS<br>(pH 7,4) lösen<br>auf 60 °C erhitzen und unter Rühren 5 min<br>bei dieser Temperatur halten<br>Natriumhydroxid zugeben bis Lösung klar<br>wird (ca. 100-150 µL)<br>auf RT abkühlen lassen<br>pH mit Salzsäure auf 7,4 einstellen mit 1x<br>PBS (pH 7,4) auf 1000 mL auffüllen |
| 10x TBE  | 108 g Trisbase<br>55 g Borsäure<br>9,05 g EDTA-Tetranatriumsalzhydrat<br>gelöst in 1000 mL Aqua bidest.<br>pH der Lösung auf 8,4 einstellen  |
| 0,5x TBE   | 10x TBE 1:20 in Aqua bidest. lösen   |
| Lösungen für die Histologie:                     |  |
| 1% Alcianblau                                    | 0,25 g Alcianblau<br>gelöst in 25 mL Aqua bidest. pH auf 1,0<br>einstellen   |
| 1% Alizarin Red S-Lösung                         | 0,25 g Alizarin Red S<br>gelöst in 25 mL Aqua bidest. 250 µL 25%<br>Ammoniak<br>pH auf 4,3-4,6 einstellen  |

|  |  |
|--|--|
| Hämatoxylin-Lösung                             | 1 g Hämatoxylin<br>gelöst in 1000 mL Aqua bidest.<br>0,2 g Natriumiodid<br>50 g Aluminiumkaliumsulfat<br>50 g Chloralhydrat<br>1 g Zitronensäure<br>unter Schütteln lösen<br>vor und nach Gebrauch steril filtriert  |
| 1% Eosin                                       | 1 g Eosin<br>gelöst in 100 mL Aqua bidest.<br>1 Tropfen Essigsäure zugegeben   |
| Oil Red O-Stammlösung                          | 0,5 g Oil Red O<br>in 100 mL 99% 2-Propanol lösen  |
| Oil Red-O Gebrauchslösung                      | Oil Red-O Stammlösung 6:4 in Aqua bidest. lösen und 24 h bei RT lagern vor Gebrauch filtriert  |
| 4% Paraformaldehyd-Lösung                      | 4 g Paraformaldehyd in 75 mL 1x PBS (pH 7,4) gelöst auf 60 °C erhitzt und unter Rühren 5 min bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend Natriumhydroxid zugegeben bis Lösung klar wurde (ca. 100-150 µL) auf RT abkühlen lassen<br>pH mit Salzsäure auf 7,4 einstellen mit 1x PBS (pH 7,4) auf 1000 mL auffüllen |
| Kernechtrot-Lösung                             | 5g Aluminiumsulfat<br>gelöst in 1000 mL Aqua bidest. erhitzt bis zum Kochen 0,1 g Kernechtrot hinzugegeben und nach Abkühlen filtriert   |
| Lösungen für die Immunhistochemie:             |  |
| Blockierungslösung für die endogene Peroxidase | 1 mL 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>gelöst in 9 mL PBS-Tween   |
| 0,1% PBS-Tween (PBST)                          | 10 µL Tween 20<br>gelöst in 10 mL 1x PBS   |
| 0,5% BSA/PBS                                   | 0,05 g BSA<br>gelöst in 10 mL PBS, aliquotiert bei -20°C gelagert  |

### 3.1.8 Bausätze und Kits

Tab. 8: Bausätze und Kits

|   |  |
|---|--|
| Nucleospin® RNA II isolation kit                  | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland   |
| GelRED™   | GeneON GmbH, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland  |
| GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase                    | Promega GmbH, Mannheim, Deutschland<br>Inhalt:<br>- GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase 5 U/<br>µL<br><br>- 5x Green GoTaq® Flexi Puffer - 25 mM<br>MgCl <sub>2</sub>   |
| VECTOR® NovaRED™ peroxidase substrate kit SK-4800 | Vector Laboratories Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika<br>Inhalt<br><br>- VECTOR® NovaRED™ Reagenz 1<br><br>- VECTOR® NovaRED™ Reagenz 2<br><br>- VECTOR® NovaRED™ Reagenz 3<br><br>- Hydrogen Peroxide Lösung |
| VECASTAIN® UNIVERSAL Elite® ABC KIT               | Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA<br>Inhalt:<br><br>- VECASTAIN® Horse Normal Serum<br><br>- VECASTAIN® Biotynlierter universeller Antikörper<br><br>- VECASTAIN® Reagenz A<br><br>- VECASTAIN® Reagenz B            |

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| VECASTAIN® RABBIT IgG Elite® ABC KIT | Vector Laboratories Inc., Burlingame,<br>Vereinigte Staaten von Amerika<br><br>- VECASTAIN® Horse Normal Serum<br><br>- VECASTAIN® Biotynlierter universeller<br>Antikörper<br><br>- VECASTAIN® Reagenz A<br><br>- VECASTAIN® Reagenz B |
| M-MLV Reverse Transkriptase Set      | Promega GmbH, Mannheim, Deutschland<br>Inhalt:<br>- M-MLV Reverse Transkriptase 200 U/µL<br><br>- 10x M-MLV Reverse Transkriptase Puffer  |

### 3.1.9 Laborgeräte

Tab. 9: Laborgeräte

|   |   |
|---|---|
| Accu-jet pro Pipette                          | Brand, gekauft bei A. Hartenstein GmbH,<br>Würzburg, Deutschland  |
| Systec Laborautoklave VX-75                   | Systec GmbH, Linden, Deutschland                                  |
| AxioCAM MRc Digitalkamera                     | Carl Zeiss Jena GmbH, Jena,<br>Deutschland                        |
| Photometer                                    | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                                |
| Heracell 240i CO2 Incubator                   | Thermo Electron GmbH,<br>Oberschleißheim, Deutschland             |
| Glasware                                      | Schott, gekauft bei A. Hartenstein GmbH,<br>Würzburg, Deutschland |
| Kühlschrank (fresh-center)                    | Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe,<br>Deutschland                |
| Magnetrührer                                  | A. Hartenstein GmbH, Würzburg,<br>Deutschland                     |
| Pipetten (bis 10 µL, bis 100 µL, bis 1000 µL) | ABIMED Analysetechnik GmbH,<br>Langenfeld, Deutschland            |

|  |  |
|--|--|
| Neubauer Zählkammer                                  | Marienfeld Laboratory Glasware, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Laborspülmaschine Compact-Desinfector                | 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 economic (-20°C)                       | Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland  |
| Tiefkühltruhe IIShin (-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                                     |  |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| 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 Imager c400            | azure biosystems, Dublin, USA  |
| Mikro-Zentrifuge FugeOne®    | STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland                                       |
| Mikrowelle Panasonic NN-3206 | Panasonic Marketing Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland                  |
| BD™ LSR II                   | BD Bioscience, San Jose, USA   |

### 3.1.10 Software

Tab. 10: Software

|                    |  |
|--------------------|--|
| AxioVision         | Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland  |
| AzurSpot           | Azur Biosystems, Dublin, USA   |
| Endnote X9         | Bilaney Consultants GmbH, Studentenlizenz über die Universität Würzburg, Deutschland |
| Excel              | Microsoft Office, Studentenlizenz über die Universität Würzburg, Deutschland         |
| FlowJo 10.5.3      | FlowJo LLC, Ashland, USA   |
| Gel Analyzer 2010  | gelanalyzer.com, © Dr. Istvan Lazar  |
| Photoshop Elements | Adobe, gekauft von der Universität Würzburg, Deutschland                             |
| Word               | Microsoft Office, Studentenlizenz über die Universität Würzburg, Deutschland         |

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Isolieren und Kultivieren von hMSCs**

#### **3.2.1.1 Isolierung von hMSCs aus Nativgewebe**

In Übereinkommen mit der Ethikkommission der Universität Würzburg, unter dem Aktenzeichen AZ-82/08, erfolgte die Isolierung von hMSCs aus sechs verschiedenen Geweben des Kniegelenkes. Dabei handelte es sich um Knochen, Knorpel, Synovialkapsel, das vordere Kreuzband, die Menisken sowie den Hoffa-Fettkörper. Diese Gewebe wurden, nach vorherigem Einverständnis der Patientinnen, bei Implantation einer totalen Kniegelenksprothese von Arthrosepatientinnen für diesen Forschungszweck gewonnen. Verwendet wurden die Materialien von fünf unterschiedlichen Patientinnen in einem Alter zwischen 46 und 58 Jahren (Durchschnittsalter 52). Die Entnahme des Gewebes erfolgte intraoperativ unter sterilen Bedingungen und wurde in einem sterilen Behältnis umgehend ins Labor gebracht, wo es dann im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Weiterverarbeitung zwischengelagert wurde. Bei der anschließenden Verarbeitung wurde gleichzeitig auch von jeder Gewebeprobe ein kleines Stück für eine orientierende histologische Analyse, mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung und mikroskopischer Betrachtung, abgetrennt und zur weiteren Lagerung in ein separates, mit Ethanol gefülltes, 15 mL Tube gegeben. Zur Gewinnung der Zellen aus dem Knochenmaterial wurde dieses manuell zerkleinert sowie versucht durch Auskratzen mittels einer scharfen Kürette, möglichst viel des Knochenmarks und der Knochenpongiosa zu gewinnen, welches dann gesammelt in Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 50 mL gepackt wurde. Diese Röhren wurden nach Auffüllen mit DMEM/Ham's F12-Medium auf ein Gesamtvolumen von 50 mL per Hand geschüttelt, bevor sie dann für 5 min bei 200 x g zentrifugiert wurden. Der danach bestehende Überstand mit der aufgelagerten Fettschicht wurde



anschließend mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde das Röhrchen erneut mit 10 mL MSC-Medium gefüllt und zum weiteren Herauslösen von hMSCs aus den Knochentrabekeln mit Hilfe des Vorstehers durchgemischt. Nach einer kurzen Ruhephase, in der sich die schweren Anteile des Knochensediment absetzen konnte, wurde die entstandene Zellsuspension über ein Zellsieb mit einer Maschendichte von 100  $\mu\text{m}$  pipetiert und damit in ein neues Zentrifugenröhrchen von 50 mL Volumen transferiert. Diese neu gewonnene Zellsuspension wurde anschließend erneut bei 200 x g für 5 min zentrifugiert und anschließend der neue Überstand wieder vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Nun wurde die dadurch am Boden verbliebene Zellsuspension mit MSC-Medium auf 10 mL Gesamtvolumen aufgefüllt und die die Zellen durch ein vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

Zu der Gewinnung von Zellen aus dem Knorpel wurde dieser zuerst mit einem Skalpell vorsichtig von der Knochenoberfläche abgelöst und danach manuell zerkleinert. Das zerkleinerte Material wurde anschließend in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt, welches dann mit 1 mL Pronase 1,95% und 20 mL MSC-Medium aufgefüllt wurde und für 1 Stunde auf einem Rotator bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurde. Danach wurde diese Suspension für 5 min bei 200 x g zentrifugiert und der entstandene Überstand mit Hilfe einer Pasteurpipette abpipetiert und verworfen. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen erneut mit 36 mL MSC-Medium und 4 mL Kollagenaselösung aufgefüllt. Dies wurde nun über Nacht erneut auf dem Rotator im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die so entstandene Zellsuspension über ein 100  $\mu\text{m}$ -Zellsieb in ein neues 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde das Röhrchen mit 10 mL MSC-Medium gefüllt. Die Resuspension der Zellen erfolgte durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Um Zellen aus dem Meniskus, dem Hoffa-Fettkörper, dem vorderen Kreuzband und der Synovia zu gewinnen wurden die Materialien zuerst

manuell mit Hilfe von sterilen Pinzetten, Scheren und Skalpellen stark zerkleinert, um eine möglichst hohe Materialoberfläche zu erzeugen. Anschließend wurde das jeweilige Material in einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen gesammelt, welches mit 20 mL MSC-Medium und 4 mL Kollagenaselösung aufgefüllt wurde. Zur Lösung der Zellen von dem Material wurden die gefüllten Zentrifugenröhrchen über Nacht auf einem Rollbrett im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die so entstandene Zellsuspension über ein 100 µm-Zellsieb in ein neues 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Anschließend wurde das Röhrchen mit 10 mL MSC-Medium gefüllt und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

Um den Anteil vitaler Zellen zu bestimmen, wurde von den Zellsuspensionen je 10 µL entnommen und in eine Mischung aus 30 µL PBS und 10 µL Trypanblaufärbelösung vermengt (Verdünnung 1:50). Bei diesem Vorgang nehmen die bereits avitalen Zellen den Farbstoff auf, während die noch vitalen Zellen ungefärbt bleiben. Zur Auszählung wurden nun 10 µL (Verdünnung 1:500) dieser neuen Suspension in die Neubauer Zählkammer gegeben. Durch die folgende Formel konnte nun die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt und für die gesamte Zellsuspension hochgerechnet werden:

**[Mittelwert an vitalen Zellen aus allen 4 Quadranten] x [10<sup>4</sup>] x [500] x [X]**

10<sup>4</sup> = Kammerfaktor; 500 = Verdünnungsrate; mit X = Gesamtvolumen an Zellsuspension

Anschließend wurden ca. 4 x 10<sup>6</sup> vitale Zellen/cm<sup>2</sup> Kulturfläche in Zellkulturflaschen mit 175 cm<sup>2</sup> Größe ausgesät und bei 37°C in einem Brutschrank mit einer feuchten Atmosphäre (95% Luft, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Wurde die benötigte Zellzahl nicht erreicht, wurden die Zellen zuerst in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät. Dabei wurde das berechnete Volumen der Zellsuspension mit MSC-Medium aufgefüllt, so dass ein Gesamtvolumen von 25 mL in der 175 cm<sup>2</sup>, beziehungsweise 15 mL in der 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche erreicht

wurde. Nach einer Zeit von 72 h wurde das Medium mitsamt der nicht-adhären Zellen vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Die adhären Zellen wurden im Anschluss vorsichtig mit PBS gespült und anschließend die Flasche erneut mit MSC-Medium auf 25, bzw. 15 mL aufgefüllt. Ab nun erfolgte dreimal wöchentlich ein Mediumwechsel mit MSC-Medium bis eine Zellkonfluenz von circa 90% innerhalb der Kulturflasche erreicht wurde.

### **3.2.1.2 Ablösen und Kryokonservierung der hMSCs**

Um die Zellen zu „Ernten“ wurde das Medium zunächst gänzlich abgesaugt sowie die Zellen fünf Minuten mit PBS/EDTA gewaschen, um alle Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden im Anschluss zur Ablösung zwei Minuten mit 5 mL 0,25% Trypsin/EDTA benetzt und im Brutschrank inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde dann die doppelte Menge MSC-Medium dazugegeben und die Zellsuspension in ein 50 mL-Tube überführt. Zur Entfernung des Trypsins wurde das Tube nun für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml MSC-Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der nun vorhandenen Zellzahl wurde nun erneut der Anteil vitaler Zellen in der Suspension mittels der Neubauer Zählkammer bestimmt. Um die gewonnenen Zellen besser lagern zu können, wurde diese nun kryokonserviert. Dafür wurde diese auf Kryotubes aufgeteilt. Pro Tube wurde eine Zellzahl von mindestens  $5 \times 10^5$ , jedoch besser mindestens  $1 \times 10^7$  benötigt, welche dann in 1,5 mL eines Konservierungsmedium bestehend aus 50% FCS, 40% MSC-Medium sowie 10% DMSO bei  $-80^\circ\text{C}$  eingelagert wurden. Nach Bestimmen der Zellzahl wurde das benötigte Konservierungsmedium angesetzt und die Zellsuspension erneut bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in dem Konservierungsmedium resuspendiert, bevor es zügig auf die vorbereiteten Kryotubes aufgeteilt und sofort eingefroren wurde. Dies muss zügig geschehen,

da das DMSO sonst in die Zellen eindringt und diese zerstört.

### **3.2.2 Differenzierung von hMSCs**

Um die hMSCs differenzieren zu können, wurde mit verschiedenen Wachstumsmedien drei verschiedene Bedingungen geschaffen, in denen die zuvor isolierten nativen hMSCs nun dazu angeregt wurden, sich adipogen, osteogen oder chondrogen zu differenzieren. Auftauen von hMSCs Nach erfolgreicher Gewinnung von hMSCs aus allen zu untersuchenden Geweben wurde nun zur weiteren Verarbeitung von den zuvor kryokonservierten Zellen jeweils ein Tube aufgetaut. Dazu wurden zunächst 10 mL MSC-Medium in ein 15 mL Tube vorgelegt und dieses dann im Inkubator bei 37°C gelagert. Die Kryotubes wurden in der Zeit bei Raumtemperatur auf Eis langsam wieder aufgetaut. Sobald diese aufgetaut waren, wurde der Inhalt zügig mit einer Pipette in die vorgewärmten 15 mL Tube überführt. Diese wurden nun, zur Entfernung des Konservierungsmediums, für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 mL frischem MSC-Medium erneut resuspensiert. Die resuspensierten Zellen wurden nun erneut in 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät und mit MSC-Medium auf 25 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Es erfolgte eine erneute Wachstumsphase, bis wieder eine Konfluenz von ungefähr 90% erreicht wurde. Sobald diese erreicht war, wurden die Zellen erneut, wie bereits dargestellt, abgelöst, aufgereinigt und in 20 mL MSC-Medium resuspensiert und ausgezählt. Wenn ein Volumen von mindestens  $3 \times 10^6$  Zellen vorhanden war, konnte mit der Differenzierung begonnen werden.

#### **3.2.2.1 Monolayer Kulturen für die adipogene und osteogene Differenzierung**

Für die adipogene sowie die osteogene Differenzierung wurden jeweils zwei 6-well Platten als auch für die osteogene Differenzierung zusätzlich ein 4 Kammer

Chamberslide mit einem definierten Zellvolumen gefüllt. Von diesen dienten bei jeder 6-Well Platte je drei der Wells zur Differenzierung und die Übrigen zur Kontrolle. Bei den Chamberslides dienten je zwei Kammern zur Differenzierung und die anderen beiden Kammern zur Kontrolle. Für die Monolayerkulturen wurde aus der, wie in 2.2.2.1 beschriebenen, Zellsuspension das für die Anzucht benötigte Volumen errechnet und in ein neues Tube überführt. Für die 6-Well Platten wurden jeweils  $3 \times 10^4$  Zellen pro Well eingesetzt, während die Chamberslides mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^3$  Zellen pro Kammer gefüllt wurden. Es wurde dementsprechend aus der Zellsuspension ein Volumen errechnet, in dem  $3,6 \times 10^5$  Zellen für die jeweils zwei 6-Well Platten, bzw.  $2 \times 10^4$  vorhanden waren. Für die zwei 6-Well Platten wurde das errechnete Volumen dann in einem 15 mL-Tube mit MSC-Medium bis zu einem Volumen von 12 mL aufgefüllt und danach vermischt durch vorsichtiges auf- und abpipettieren. Aus dieser Suspension wurde nun je 1 mL in ein Well, in die zuvor jeweils 1 mL MSC-Medium vorgelegt wurde, pipettiert und durch behutsames Schwenken der Platten gleichmäßig verteilt. Analog wurde die für die Chamberslides zuvor errechnete Menge der Zellsuspension in einem 15 mL-Tube auf 4 mL aufgefüllt und jede Kammer mit 1 mL gefüllt. Damit die Zellen adhären konnten, wurden die Platten im Anschluss für etwa 48 h im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Vor der eigentlichen Differenzierung wurden nun wieder alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt, bis eine Konfluenz erreicht wurde.

### **3.2.2.1.1 Adipogene Differenzierung**

Sobald die Wells konfluent bewachsen waren, wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt, bei welchem nun statt MSC-Medium bei drei Wells pro Platte ein Kontrollmedium bestehend aus DMEM/HAM'S F-12, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (100x). Bei den jeweils anderen drei Wells wurde als Differenzierungsmedium DMEM High Glucose (4,5 g/L), 10% FCS, 1%

Penicillin/Streptomycin (100x), 1  $\mu$ M Dexamethason, 500  $\mu$ M IBMX, 1  $\mu$ g/mL Insulin sowie 100  $\mu$ M Indomethacin vor jedem Mediumwechsel frisch angesetzt und beim Mediumwechsel verwendet. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen über 21 Tage dem Differenzierungsreiz ausgesetzt, wobei der Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage erfolgte, um eine dauerhaft gute Versorgung mit den benötigten Nährstoffen zu gewährleisten. Am Ende der 21 Tage erfolgte von je drei Kontroll- und drei Differenzierungslinien eine Färbung mit Oil-Red. Die restlichen Zellen wurden zur weiteren Bearbeitung „geerntet“. Dafür wurde aus den Wells zunächst vorsichtig mit einer Pasteurpipette das Medium abgesaugt und die Wells anschließend mit PBS gespült. Danach wurden die drei Wells mit insgesamt 350  $\mu$ L RA1 aus dem RNA Isolationsset von Macheray & Nagel beträufelt und die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber mechanisch abgelöst und zusammen in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt, welches vor der weiteren Verbreitung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren um im Anschluss anschließend bei -80°C gelagert zu werden.

### **3.2.2.1.2 Osteogene Differenzierung**

Analog zu den Zellen der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen zur osteogenen Differenzierung vorbereitet und nach Erreichen der Konfluenz mit einem Differenzierungsmedium versorgt. Für die Kontrollgruppe wurde dabei das gleiche Medium wie bei der Kontrolle der adipogenen Differenzierung verwendet. Bei den Zellen, welche dem Differenzierungsreiz ausgesetzt wurden, bestand das Medium aus DMEM High Glucose (4,5 g/L), 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin (100x), 50  $\mu$ g/mL L-Ascorbin-Säure-2-Phosphat, 100 nM Dexamethason und 10 mM Glycerophosphat. Dieses wurde, ebenso wie das adipogene Differenzierungsmedium, vor jedem Mediumwechsel frisch angesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte dabei über einen Zeitraum von 21 Tagen alle 2-3 Tage. Anschließend wurde eine der zwei 6-Well Platten mit Alizarin-Rot

für die histologische Untersuchung gefärbt, während die Zellen der andere 6-well Platte analog zur adipogenen Differenzierung für die molekulargenetische Untersuchung geerntet wurden. Die Chamberslide-Platten wurden ebenfalls nach den 21 Tagen zur weiteren Auswertung vorbereitet. Dafür wurde das Medium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Kammern 3x mit PBS gespült und anschließend für 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert und luftgetrocknet.

### **3.2.2.2 Pellet-Zellkulturen für die chondrogene Differenzierung**

Im Gegensatz zu den Zellen der adipogenen und osteogenen Differenzierung wurden die Zellen zur chondrogenen Differenzierung nicht als Monolayer sondern als Pellet-Zellkultur verarbeitet. Für jedes Gewebe wurden dabei acht Pellets erstellt. Von diesen dienten je vier Pellets zur Differenzierung und vier als Kontrollgruppe. Pro Pellet wurde eine Zellzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen verwendet, so dass eine Gesamtzellzahl von  $2,4 \times 10^6$  Zellen benötigt wurde. Zur Herstellung der Pellet-Zellkulturen wurden die Zellen zunächst, wie bereits in Kapitel 3.2.2 erörtert vorbereitet. Das errechnete Volumen wurde dann anschließend in ein neues 50 mL-Tube überführt. Im Anschluss wurde dieses für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand aus MSC-Medium vorsichtig abgesaugt. Das am Boden verbliebene Zellpellet wurde dann in serumfreien DMEM/HAM's F-12 Medium resuspendiert und 3x gewaschen, um keine Serumreste zu haben. Nach dem letzten Waschschriff wurden die in DMEM/HAM's F-12 Medium befindlichen Zellen zu je 10 mL auf zwei frische 15 mL-Tubes aufgeteilt, ein weiteres Mal für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der entstandene Überstand erneut verworfen. Die Zellen, welche zur Differenzierung dienten, wurden nun in 2 mL chondrogenem Differenzierungsmedium bestehend aus DMEM High Glucose (4,5 g/L), 1% Penicillin/Streptomycin (100x), 50 µg/mL L-Ascorbin-Säure-2-Phosphat, 100nM

Dexamethason, 100 µg/mL Pyruvat, 40 µg/mL L-Prolin, 1% ITS<sup>1+</sup> und 10 ng/mL TGF-β1 resuspendiert und zu je 0,5 mL auf für 15 mL Tubes verteilt. Die als Kontrolle dienenden Zellen wurden analog in Kontrollmedium bestehend aus DMEM High Glucose (4,5 g/L) und 1% Penicillin/Streptomycin (100x) resuspendiert. Anschließend wurden alle Tubes wieder für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Deckel der Tubes wurden nun, zur Gewährleistung einer Sauerstoffzufuhr, um ein Viertel aufgedreht und die Tubes anschließend im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert.

#### **3.2.2.2.1 Chondrogene Differenzierung**

Die, wie in 3.2.2.2 beschrieben, vorbereiteten hMSCs, wurden für 28 Tage im Inkubator gelagert. Innerhalb der ersten drei bis vier Tage formten sich die Pellets. Danach erfolgte zweimal wöchentlich ein Mediumwechsel mit dem vorher beschriebenen chondrogenen Differenzierungs- beziehungsweise dem chondrogenen Kontrollmedium. Um das Pellet nicht zu zerstören, wurde das ältere Medium unter großer Vorsicht mit Hilfe einer Pasteurpipette abpipettiert sowie anschließend mit 2 mL frischem Medium ersetzt. Nach 28 Tagen wurden die Pellets geerntet und zur weiteren histologischen sowie molekularbiologischen Untersuchung vorbereitet.

### **3.2.3 Histologische Untersuchungen**

#### **3.2.3.1 Silanisierung von Objektträgern**

Als Silanisierung wird die chemische Anbindung einer Silangruppe an eine Oberfläche bezeichnet. Durch die Silangruppe wird die Oberfläche beschichtet und so die Haftbarkeit an derselbigen verbessert. Dieser Prozess ermöglichte



das Auftragen der weichen Gewebe auf den Objektträgern, welche ansonsten nicht genug Halt boten für die in Paraffin eingebetteten Schnitte. Die Silanisierung der unbeschichteten Objektträger erfolgte dabei mit 3-(Triethoxysilyl)-propylamin nach dem folgenden Protokoll:

| Verweildauer in Lösung | Lösung                           | Temperatur [°C] |
|------------------------|----------------------------------|-----------------|
| 5 min                  | Aceton                           | RT              |
| 5 min                  | 2% 3-(Triethoxysilyl)-propylamin | RT              |
| 5 min                  | Aceton                           | RT              |
|                        | spülen in H <sub>2</sub> O dest. | RT              |

Nachdem die so silanisierten Objektträger über Nacht getrocknet waren, konnten sie zum Auftragen von histologischen Schnitten verwendet werden.

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

Für eine erste optische orientierende Analyse der unterschiedlichen nativen Gewebeproben, aus welchen wie bereits beschrieben die hMSCs gewonnen wurden, sowie zur Analyse der finalen Differenzierungen der verschiedenen Zellreihen wurden mithilfe histologischer Arbeitsmethoden gewebspezifische Anteile gefärbt. Zur Untersuchung der nativen Gewebe des Kniegelenkes, aus denen die hMSCs gewonnen wurden, erfolgte bei diesen, wie anschließend im nächsten Kapitel beschrieben, eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung zur Darstellung der Struktur. Hierzu mussten die Proben zunächst fixiert werden und eine Einbettung in Paraffin erfolgen. Dafür wurden bei den, in Kapitel 3.1.1 beschriebenen zerkleinerten Gewebe, ein 1-2 mm<sup>2</sup> großes Gewebestück in einem 15 mL-Tube mit 5 mL 4% Formaldehyd (FA) für mindestens 5 Tage fixiert. Anschließend wurde das 4% FA vorsichtig abpipettiert und gegen 5 mL PBS

ausgetauscht, in welchem das Gewebe bis zur Einbettung in Paraffin gelagert wurde. Für die Einbettung wurde die native Gewebsprobe zunächst in eine Einbett-Kassette gelegt und anschließend nach dem folgenden Protokoll maschinell, durch das Durchlaufen diverser Lösungen, in Paraffin eingebettet:

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

Nach Durchlaufen des Programmes wurde die in Paraffin eingebetteten Proben noch „aufgeblockt“. Dafür wurden sie zuerst für circa 15 min in 60 °C warmen, flüssigen Paraffin angewärmt. Anschließend wurde eine Formschale aus Metall ungefähr zur Hälfte mit geschmolzenem Paraffin gefüllt, bevor, mithilfe einer Pinzette, die Proben aus der Einbett-Kassette in der Mitte der Schale mit der Schnittfläche nach unten platziert wurden. Dann wurde die Schale auf einer 10 °C warmen Kühlplatte platziert und vor dem vollständigen Aushärten mit flüssigem Paraffin auf ein Volumen von circa 90% aufgefüllt und die Kassette daraufgelegt. Abschließend wurden die aufgeblockten Proben für 4h bei RT zum Aushärten ruhen gelassen. Danach konnten die ausgehärteten Blöcke aus der Schale entnommen werden und wurden bis zum Schneiden bei 4 °C gelagert.

### 3.2.3.3 Schneiden und Entparaffinieren der nativen Gewebeproben

Zum Zuschneiden wurden die in Paraffin aufgeblockten, nativen Gewebeproben aus der Lagerung ohne voriges aufwärmen umgehend in die Schneidemaschine eingespannt und anfangs zunächst das überschüssige Paraffin in 30 - 40 µm dicken Schritten abgetragen. Sobald die eigentliche Probe erreicht war, wurde die Dicke der Schnittschichten auf 4 µm reduziert. Die entstandenen Schnitte wurde dann behutsam zuerst kurz in ein Bad aus Wasser mit Ethanol getaucht und anschließend in ein warmes Wasserbad gelegt. Aus diesem wurden die Schnitte dann auf einen, wie zuvor beschrieben, silanisierten Objektträger gezogen und zum Trocknen auf eine Wärmeplatte gelegt. Die Entparaffinierung erfolgte im nächsten Schritt nach diesem Protokoll:

| Verweildauer in Lösung | Lösung                           | Temperatur [°C] |
|------------------------|----------------------------------|-----------------|
| 5 min                  | Xylol I                          | RT              |
| 5 min                  | Xylol II                         | RT              |
| 1 min                  | 96% EtOH I                       | RT              |
| 1 min                  | 96% EtOH II                      | RT              |
| 1 min                  | 70% EtOH                         | RT              |
| 1 min                  | 50% EtOH                         | RT              |
|                        | spülen in H <sub>2</sub> O dest. | RT              |

### 3.2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um eine gute Übersicht über die verwendeten Materialien zu gewinnen wurden die nativen Proben mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dabei werden basophile

Strukturen, wie bspw. die Phosphorsäureketten der Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Ribosomen des Zellkerns, durch das basische Hämalaunblau gefärbt. Die azidophilen Strukturen, wie Proteine und aus Proteinen gebildete Strukturen, wie zum Beispiel Kollagene, werden hingegen durch den sauren Farbstoff Eosin rot eingefärbt.

Die entparaffinierten, nativen Gewebeproben wurden nach dem folgenden Protokoll gefärbt:

| 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                                    |

Um die Proben gut unter dem Mikroskop untersuchen zu können, wurden die verwendeten Objektträger abschließend mit Entellan benetzt sowie ein Deckglas aufgelegt und über Nacht trocknen gelassen.

### 3.2.3.5 Oil RedO-Färbung

Mit Hilfe der Oil RedO-Färbung wurden die Monolayer Zellkulturen der adipogenen Differenzierung sowie ihre Kontrollen gefärbt, um die Ausprägung fettgewebespezifischer Merkmale vergleichen zu können. Es werden dabei durch die Oil RedO-Lösung die Triacylglyceride, welche ein Bestandteil der für Fettgewebe typischen Lipidtröpfchen bilden, rot angefärbt. Mit Hilfe der Gegenfärbung mittels Hämalaun werden die Zellkerne blau angefärbt. Die positive Färbung der Lipidtröpfchen, welche die hMSCs im Rahmen der adipogenen Differenzierung ausbilden, gilt hierbei als Marker für das adipogene Differenzierungspotential der Zellen. Zur Herstellung der für die Färbung benötigten 0,3% Gebrauchslösung wurden am Tag vor der Färbung sechs Teile der 0,5% Oil Red O-Stammlösung mit vier Teilen H<sub>2</sub>O dest. gemischt und über 24h bei RT gelagert. Vor der Verwendung wurde die so hergestellte 0,3% Lösung zur Säuberung von Unreinheiten über einen Papierfilter laufen gelassen. Die Fixierung der Zellen und die Oil RedO-Färbung wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

| 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 % Gebrauchslösung Oil RedO    |
|                        | waschen in 60% Isopropanol        |
|                        | waschen in H <sub>2</sub> O dest. |

|       |                 |
|-------|-----------------|
| 3 min | Hämalaun-Lösung |
| 24 h  | trocknen bei RT |

Die so gefärbten Wells konnten anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

### 3.2.3.6 Alizarin Red S-Färbung

Zum Vergleich der Entwicklung osteogener Merkmale der osteogen differenzierten Monolayer-Zellkulturen und der zugehörigen Kontrollen wurde die Alizarin Red S-Färbung verwendet. Dabei bildet die Alizarin Red S-Lösung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, welche in Form von Calciumphosphat Komplexen ein typischer Bestandteil der ausgehärteten Matrix osteogener Gewebe bildet, einen roten Farbstoff. Somit gilt die positive Färbung mit Alizarin Red S als ein Marker für eine osteogene Differenzierung der hMSCs.

Die Fixierung sowie die Färbung der hMSCs wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

| Verweildauer in Lösung | Lösung  |
|------------------------|---|
|                        | waschen in 1x PBS <sup>-</sup>                |
| 10 min                 | fixieren in eiskaltem Methanol                |
|                        | waschen in H <sub>2</sub> O dest.             |
| 2 min                  | 1% Färbelösung                                |
|                        | dreimaliges waschen in H <sub>2</sub> O dest. |
| 24 h                   | trocknen der gefärbten Wells bei RT           |

Die so gefärbten Wells konnten anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

### **3.2.3.7 Kryokonservierung der Pellet-Zellkulturen**

Um die Pellet-Zellkulturen der chondrogenen Differenzierung histologisch und immunhistologisch auswerten zu können, wurde jeweils eins der differenzierten Pellets, sowie eine der zugehörigen Kontrolle verwendet. Dafür wurden Kryoschnitte der Pellets angefertigt. Im ersten Schritt wurde dafür das Medium aus dem 15 mL-Tube abgesaugt und das Pellet dreimal in 1x PBS<sup>-</sup> gewaschen. Anschließend wurde Tissue-Tek<sup>®</sup> in dem Deckel eines 1,5 mL Eppendorf-Gefäßes vorgelegt. Das Pellet wurde nun kurz, mit Hilfe einer feinen Pinzette, in einen Tropfen 1% Eosin-Lösung getaucht, um es rot einzufärben, wodurch das spätere Wiederfinden im Kryoschnitt erleichtert wurde. Das gefärbte Pellet wurde dann im Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet und das Eppendorf-Gefäß kopfüber in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor es bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert wurde.

### **3.2.3.8 Erstellen von Kryoschnitten der Pellets**

Um die kryokonservierten Pellets färben zu können, mussten zunächst Schnitte der Präparate angefertigt werden. Die Schnitte wurden dabei im Kryostat erstellt. Der Innenraum des Kryostats ist dabei auf -22 °C runtergekühlt und die Klinge auf -10° C gekühlt, um eine saubere Schnittführung zu ermöglichen. Anschließend wurden die zuvor bei -20 °C gelagerten eingebetteten Pellets aus dem Deckel des Eppendorf-Gefäßes ausgelöst und mit einem Tropfen Tissue-Tek<sup>®</sup> auf einem Objektträger befestigt. Der so fixierte Block wurde nun zuerst bei einer 30 µm Schnittdicke angeschnitten, bis das Eosin gefärbte Pellet erreicht wurde. Zur Herstellung der Kryoschnitte wurde die Schnittdicke nun auf 10 µm geändert. Die so entstehenden Schnitte wurden dann auf einen SuperFrost<sup>®</sup> Objektträger aufgetragen und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.



### 3.2.3.9 Alcian Blau-Färbung

Zum Vergleich der Entwicklung von chondrogenen Merkmalen wurden Schnitte der chondrogen differenzierten Pellet-Kulturen mit Alcian Blau gefärbt. Negativ geladene Proteoglykane, welche einen Bestandteil der extrazellulären Matrix chondrogener Gewebe darstellen, werden durch die Lösung blau gefärbt. Eine positive Färbung gilt dabei als ein Marker für ein chondrogenes Differenzierungspotential der Gewebe, da sulfatierte Proteoglykane in großer Menge in chondrogenen Geweben anzutreffen sind, da sie diesen die für Knorpel typische Gleitfähigkeit und Puffereigenschaft verleihen. Die Färbung der Pellets erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

| Verweildauer in Lösung | Lösung                            |
|------------------------|-----------------------------------|
| 3 min                  | 3% Essigsäure                     |
| 30 min                 | 1% Alcian Blau-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                          |

Abschließend wurden die Objektträger mit Entellan bedeckt und ein Deckglas aufgelegt. Nach dem Trocknen konnten diese Schnitte am Mikroskop ausgewertet werden.

### 3.2.3.10 Immunhistologie

Um spezifische Antigene darstellen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen der osteogen und chondrogen differenzierten hMSCs angefertigt. Dabei wurden die jeweiligen Antikörper zu den Antigenen in den wie in Tab. 4 angegebenen Konzentrationen verwendet. Die Immunhistochemie der chondrogenen Differenzierungen wurden an Kryoschnitten durchgeführt, welche in gekühltem Aceton zuvor 10 min fixiert wurden. Die osteogenen Differenzierung wurden auf den Chamberslides gefärbt. Diese wurde dafür vorher dreimal in 1x PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend in eiskaltem Methanol für 10 min fixiert. Für die nächsten Arbeitsschritte wurde das VECASTAIN® UNIVERSAL ABC KIT verwendet. Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

| Verweildauer in Lösung | Arbeitsschritt in Lösung   |
|------------------------|--|
|                        | drei Mal waschen in 1x PBS <sup>-</sup>                                      |
|                        | markieren der Zellumrandung mit DarkoPen                                     |
| 10 min                 | blocken der endogenen Peroxidase in 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in PBST |
|                        | drei Mal waschen in 1x PBS <sup>-</sup>                                      |
| 30 min                 | blocken in 10% Blockierungslösung in PBST (VECASTAIN® UNIVERSAL ABC KIT)     |
| 1 h                    | inkubieren in primären Antikörper (Tab. X)                                   |
| 5 min                  | waschen in 1x PBS <sup>-</sup>   |
| 30 min                 | inkubieren in sekundärem biotinylierten Antikörper in PBS                    |
| 5 min                  | waschen in 1x PBS <sup>-</sup>   |

Die hier durchgeführte immunhistochemische Färbung basiert auf dem sogenannten A(vidin)-B(iotin)-C(omplex)-Prinzip. Durch die Färbung kann der qualitative sowie quantitative Nachweis einer Struktur erfolgen, in dem ein für sie vorgesehener antigenspezifischer, primärer Antikörper an ihr bindet. An denselbigen primären Antikörper bindet nun im nachfolgenden Schritt ein sekundärer, biotinylierter Antikörper. Das Biotin Molekül dieses sekundären Antikörpers bildet dann extrem starke Wechselwirkungen zu an Avidin gekoppelten Peroxidasen aus. Dank des Vector® NovaRED™ können diese dann in einer rötlich-braunen Färbung dargestellt werden. Nach Inkubation mit dem primären sowie dem sekundären Antikörper wurde unmittelbar anschließend die Färbung mit Vector® NovaRED™ nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

| Verweildauer in Lösung | Arbeitsschritt in Lösung                         |
|------------------------|--|
| 10 min                 | inkubieren in Vector® NovaRED™ Peroxidase Lösung |
|                        | waschen in H <sub>2</sub> O dest.                |
| 5 min                  | Gegenfärbung in Hämalaun-Lösung                  |
| 10 min                 | bläuen in Leitungswasser                         |
| 1 min                  | waschen in H <sub>2</sub> O dest.                |

Die Objektträger wurden anschließend mit Entellan benetzt und ein Deckglas aufgelegt. Danach konnten die Schnitte am Mikroskop ausgewertet werden.

### **3.2.3.10.1 Kollagen Typ II-Färbung**

Analog zu Col I, dient Col II in hyalinem Gelenkknorpel als wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Zusammen mit verschiedenen Proteoglykanen ist es

für dessen Beschaffenheit verantwortlich und dient daher als Marker für eine chondrogene Differenzierung der hMSCs. Das fibrilläre Col II setzt sich aus drei  $\alpha$ 1-Peptidketten zusammen. Bei der immunhistochemischen Färbung bindet der verwendete primäre Antikörper daher an die  $\alpha$ 1 - Peptidketten des Col II. Die Färbung wurde mit dem VECASTAIN® UNIVERSAL ABC KIT in Kombination mit dem Vector® NovaRED™ Detektionssystem durchgeführt.

#### **3.2.3.10.2 Kollagen Typ X-Färbung**

Col X ist ein weiterer Marker für eine chondrogene Differenzierung. Es spielt eine wichtige Rolle in der enchondralen Ossifikation im Rahmen des hypertrophen Wachstums postmitotischer Chondrozyten. Anders als bei den fibrillären Col I und II bilden die  $\alpha$ 1-Peptidketten eine retikuläre Struktur aus. Auch bei dieser Färbung bindet der primäre Antikörper an die  $\alpha$ 1-Peptidketten des Col X. Die Färbung wurde mit dem VECASTAIN® UNIVERSAL ABC KIT in Kombination mit dem Vector® NovaRED™ Detektionssystem durchgeführt.

### **3.2.4 Molekularbiologische Untersuchungen**

#### **3.2.4.1 Isolation des hMSC-Lysats**

Zur weiteren Analyse der differenzierten Zellen und ihrer Genexpression erfolgte am Ende der Differenzierungszeiträume eine Lysierung der Zellen, um ihre mRNA zu extrahieren. Dafür wurde das Nucleospin® RNA II Isolation Kit der Firma Machery-Nagel genutzt. Im ersten Schritt wurden die Zellen dabei mit einem Lysatpuffer, bestehend aus  $\beta$ -Mercapthoethanol und der im Kit enthaltenen RA1-Lösung (Verhältnis 1:100), versetzt.

#### **3.2.4.1.1 Lysieren der Monolayer-Zellkulturen**

Zur Lysierung der adipogen und osteogen differenzierten Monolayer Zellkulturen, wurde je eine der 6-Well Platten, auf welcher je 3 Wells zur Differenzierung und zur Kontrolle dienten, am Ende der 21 Tage genutzt. Dafür wurde zunächst das Medium abgezogen und die Wells mit 1x PBS<sup>-</sup> gewaschen. Anschließend wurden 550 µL des Lysatpuffers auf je 3 zusammengehörige Wells aufgeteilt und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig aus den Wells gelöst. Anschließend wurden die so aus den 3 Wells gelösten Zellen zusammen in ein 1,5 mL-Eppendorfgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor die Lysate bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert wurden.

#### **3.2.4.1.2 Lysieren der Pellet-Zellkulturen**

Das Lysat der chondrogenen Differenzierung und ihrer Kontrollen wurde aus je drei der vier angelegten Pellets gewonnen. Dafür wurde das Medium vorsichtig abgezogen und die Pellets vorsichtig mit 1x PBS<sup>-</sup> gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in ein 1,5 mL-Eppendorfgefäß überführt, in welchem 350 µL des Lysatpuffers vorgelegt wurden. Die Pellets wurden dann mit Hilfe einer Mikropistille zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert wurden.

#### **3.2.4.2 RNA-Isolation und Aufreinigung**

Wie bereits bei der Isolierung der mRNA wurde für die Aufreinigung der RNA das Nucleospin® RNA II Isolation Kit der Firma Machery-Nagel verwendet. Im ersten

Schritt wurde das Lysat dafür auf Eis liegend aufgetaut. Währenddessen wurde 70% EtOH in einem 2mL Tube in der Menge vorgelegt, welche auch von dem Lysatpuffer benutzt wurde (350 bzw. 550  $\mu$ L). Nun wurde eine erste Filtermembran auf dem Tube platziert, das aufgetaute Lysat darüber pipettiert und das Tube anschließend bei 11000 x g für 1 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Filtermembran verworfen und das entstandene Filtrat durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Im nächsten Schritt wurde dieses durchgemengte Filtrat in zwei Portionen über eine Silicamembran, welche in einem neuen 2 mL-Tube eingesetzt wurde, pipettiert um dann erneut bei 11000 x g für 30 sec zentrifugiert zu werden. Der entstandene Überstand in dem Tube wurde im Anschluss an die Zentrifugation verworfen, da sich die RNA durch den Lysatpuffer an der Silicamembran fixiert. Um diese wieder zu lösen wurde die benetzte Silicamembran in einem neuen 2 mL Tube platziert und mit 350  $\mu$ L Membrane Desalting Buffer (MDB) bedeckt und das Tube dann erneut für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der MDB dient dabei zur Trocknung und Entsalzung der Membran und der an ihr haftenden RNA, welches zu einem besseren DNase-Verdau führt. Für den DNase-Verdau wurde die Silicamembran mit DNase bedeckt und bei RT für 15 min stehen gelassen. Anschließend wurde die RNA in multiplen Durchläufen mit dem RA2 und RA3 Puffer aus dem Set gewaschen. Im Anschluss wurde die Silicamembran in einem neuen Nukleasefreiem 1,5 mL Eppendorf Gefäß platziert. Um die gewonnene RNA von der Silicamembran zu lösen, wurden nun 50  $\mu$ L RNase-freies H<sub>2</sub>O auf die Membran pipettiert sowie anschließend das Eppendorf Gefäß für 1 min bei 11000 x g in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Die Membran wurde dann verworfen und die gelöste, sich nun im Eppendorf Gefäß befindliche, RNA sofort auf Eis gelagert. Um die Konzentration an isolierter RNA zu bestimmen, wurde eine Probe der selbigen in einem Spectrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Bei dieser Messung konnte zusätzlich eine mögliche Verunreinigung der RNA, durch beispielsweise Proteine, genetische DNA oder Kohlenhydrate, nachgewiesen werden. Dies erfolgte anhand der Quotienten  $E_{260/280}$  und  $E_{260/230}$ . Ermöglicht wird dies durch die Tatsache, dass

Proteine im Gegensatz zur RNA Licht der Wellenlänge 280 nm und Kohlenhydrate der Wellenlänge 230 nm absorbieren. Um einen ausreichenden Reinheitsgrad der RNA zu gewährleisten, sollte der Quotient  $E_{260/280}$  größer als 2,0 sein und der Quotient  $E_{260/230}$  sich im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 befinden. Starke Abweichungen würden für eine Verunreinigung sprechen, wobei eine positive Abweichung auf eine Proteinkontamination und eine negative Abweichung auf das Vorhandensein von degradierter RNA hinweisen würde. Die isolierte und aufgereinigte RNA konnte so nun, bei -80 °C, bis zur weiterfolgenden Verarbeitung gelagert werden.

### **3.2.4.3 cDNA-Synthese**

Vorbereitend zur cDNA-Synthese wurden die in RNase-freiem Wasser gelösten RNA-Proben auf Eis gekühlt aufgetaut. Für die Synthese wurde zunächst das Volumen an gelöster RNA berechnet, welches einer Masse von 1 µg RNA entspricht. Dafür wurde mithilfe des Spektrometers bestimmte Konzentration der Lösung als Ausgangspunkt verwendet. Anschließend wurde in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß HPLC-H<sub>2</sub>O vorgelegt, so dass mitsamt der RNA ein Volumen von 11 µL vorhanden war. Dieser Mischung wurde dann im nächsten Schritt 1 µL Random-Hexamere hinzugegeben, so dass jede Probe am Ende ein Volumen von insgesamt 12 µL hatte. Die so entstandene Mischung wurde dann in einem Heizblock für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend sofort 5min lang auf Eis gelagert. Dadurch wurde eine Denaturierung der RNA und eine Anlagerung der Random-Hexamere an diese begünstigt, welche im späteren Verlauf als Primer für die Reverse Transkriptase dienten. Im nächsten Schritt wurden die Proben kurz anzentrifugiert und der Probe 8 µL „Master Mix“ hinzugefügt. Dieser Mix wurde zuvor 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 hergestellt. Um die Elongation und Synthese der cDNA-

Einzelstränge durch die Reverse Transkriptase zu ermöglichen, wurde der Ansatz nun für 60 min in einem Heizblock auf 42°C erwärmt und anschließend für 10 min in einem 70°C Heizblock erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz erneut anzentrifugiert und die Proben mit 30 µL HPLC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 50 µL aufgefüllt. Die so hergestellte cDNA konnte nun bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

#### **3.2.4.4 Semiquantitative RT-PCR**

Zur molekulargenetischen Beurteilung der Zellkulturen wurden die cDNA Einzelstränge, welche zuvor aus der isolierten RNA erzeugt wurden, mit Hilfe von Reverse Transkriptase Polymerase-Chainreaction (RT-PCR) auf Basis von Promega® GoTaq-Polymerase und unterschiedlicher Primerpaare vervielfacht. Dabei wurden alle verwendeten Reagenzien bis zur PCR auf Eis gekühlt gelagert, um keine vorzeitigen Reaktionen und Verunreinigen zu provozieren. Vor jeder PCR wurden zunächst 29 µL Master-Mix angesetzt. Da dieser nicht lange haltbar ist, wurde er für jede Probe direkt vor der PCR frisch gemischt. Der Master-Mix setzte sich zusammen aus 16,8 µL HPLC-H<sub>2</sub>O, 6 µL GoTaq- Puffer Lösung, 3 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µL 10 mM dNTPs, 1 µL 5 pmol/µL Sense - Primer, 1 µL 5 pmol/µL Antisense - Primer, sowie 0,2 µL 5000U/mL GoTaq- Polymerase. Dieser Mix wurde für jede Probe und eine Negativkontrolle, bestehend aus 1 µL HPLC-H<sub>2</sub>O, in einem PCR-Tube vorgelegt und anschließend, je 1 µL der isolierten cDNA, bzw. der Negativkontrolle hinzugefügt. Dieses wurde dann in einer Zentrifuge anzentrifugiert und vermischt. Anschließend wurden die Tubes in den Thermocycler überführt und das primerspezifische Programm zur Multiplikation gestartet.



### **3.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Um die PCR-Produkte vergleichbar zu machen und auswerten zu können, wurden diese elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Elektrophorese wurde ein 2% - Agarosegel verwendet, welches GelRed™ enthielt. Dieses wurde vor jeder Anwendung frisch hergestellt, indem 1,5 g Agarosepulver in einem Erlenmeyerkolben mit 100 mL 0,5 x - TBE-Puffer gemischt wurden und dieses vorsichtig in der Mikrowelle erhitzt wurde, bis das Pulver gänzlich in Lösung war. Nach einer anschließenden kurzen Abkühlphase wurde dieser Lösung 5 µL GelRed™ hinzugefügt. Anschließend wurde die Mischung in die Gelgießvorrichtung gegossen und zwei Kämme eingesetzt, um die späteren Taschen zu formen. Die Gelplatten wurden dann vor der Verwendung für ca. 30 min bei RT ausgehärtet und die Kämme entfernt. Danach konnten die Platten mit 0,5 x -TBE-Puffer, welcher als Laufpuffer diente, bedeckt werden und mit einer Pipette vorsichtig je 10 µL der gewünschten PCR-Produkte in die Taschen pipettiert werden. Zusätzlich wurden 3,5 µL einer 100 bp-DNA-Leiter in eine Tasche pipettiert, um die Molekülgröße einschätzen zu können. Die Auftrennung erfolgte dann über ca. 45 min bei ungefähr 145 V. Im Anschluss konnten die Gele aus der Kammer entfernt werden und mit Hilfe des Azur Spot Programms dargestellt werden. Die densitometrische Auswertung der Platten erfolgte anschließend mit der Gel Analyzer Software.

### **3.3 FACS-Analyse**

Bei der FACS-Analyse handelt es sich um eine Durchflusszytometrie. Dabei werden mit einem Antikörper markierte Zellen mit Hilfe von Laserstrahlen erkannt und maschinell gezählt und geordnet. Somit lassen sich Zellen z.B. anhand von Oberflächenmarkern, wie den CD, unterscheiden und es kann ihre Anzahl

innerhalb eines Lysates bestimmt werden. Diese Tatsache wurde sich in dieser Arbeit zu Nutze gemacht, um die Zellen mit den Oberflächenmarkern von MSCs CD90, CD105, CD73 und CD44 zu zählen.

Für die FACS-Analyse wurde pro Gewebe eine Platte mit den isolierten Zellen ausgesät und diese kultiviert, bis eine Konfluenz erreicht wurde. Hinterher wurden die Zellen, wie in 3.2.1.2 dargestellt, von den Platten gelöst und in ein 15 mL-Tube überführt. Um alle Zusätze zu entfernen, wurden die Zellen dann mit PBS gewaschen und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen gezählt und auf zwei 2,5 mL Eppendorfgefäße aufgeteilt, so dass in jedem Gefäß mind.  $5 \times 10^5$  Zellen waren. Pro Gewebe wurde zu jeweils einem dieser Gefäße je Probe 100  $\mu$ L einer AK-PBS-Mischung hinzugefügt. Diese bestand aus 83,75  $\mu$ L Pre-Mix, bestehend aus PBS/1% FCS, sowie 5  $\mu$ L CD73 PerCP, 1,25  $\mu$ L CD44 eFluor, 5  $\mu$ L CD105 APC und 5  $\mu$ L CD90 FITC. Als Negativkontrolle wurde außerdem für jedes Gewebe ein Gefäß mit 100  $\mu$ L Pre-Mix versehen. Die vorbereiteten Gefäße wurden gevortext und 30 min bei 4 °C im Dunklen gelagert. Anschließend wurden die Proben mit 2 mL PBS/1% FCS gewaschen, für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Danach erfolgte die Resuspension in je 200  $\mu$ L 2% PFA in PBS und eine erneute 15-minütige Lagerung im Dunkeln bei 4 °C. Nach 15 min erfolgte die nächste Waschung mit 2 mL PBS/1% FCS, wonach die Zellen erneut für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde erneut verworfen, die Proben in 2  $\mu$ L PBS/1% FCS resuspendiert und gevortext. Anschließend waren die Zellen bereit für die FACS-Analyse, welche mit der BD™ LSR II durchgeführt wurde. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mit der FlowJo 10.5.3 Software von FlowJo LLC.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Sämtliche Daten der semiquantitativen RT-PCR-Analyse wurden numerisch

ausgewertet und für die statistische Auswertung unter Angabe des Mittelwertes  $\pm$  Standardabweichung (SD) abgebildet. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes wurde die statistische Signifikanz ermittelt. Ein p-Wert von  $<0,5$  wurde dabei als statistisch signifikant gewertet. Insgesamt wurden je sechs Präparate ( $n = 6$ ) aus den Kniegelenken von fünf verschiedenen Patientinnen ( $m = 5$ ), zwischen 46 und 58 Jahren (Durchschnittsalter 52), verarbeitet. Alle Patientinnen erhielten eine Knie-TEP auf Grund einer fortgeschrittenen Gonarthrose und stimmten vor der operativen Therapie in die wissenschaftliche Verwendung und Aufarbeitung der Proben ein. Es wurden für die Experimente keine zusätzlichen Gewebe entnommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Isolation und Kultivierung der mesenchymalen Stromazellen aus den nativen Geweben des Kniegelenkes

#### 4.1.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung der Nativgewebe

Vor der Isolierung und Weiterverarbeitung der hMSCs für die weiteren Versuchsreihen dieser Arbeit wurden zunächst von den sechs verschiedenen Geweben des Kniegelenkes je ein kleines Stück gewonnen. Von diesen wurde zur Analyse des mikroskopischen Aufbaus und Morphologie 5 µm dicke Paraffinschnitten angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

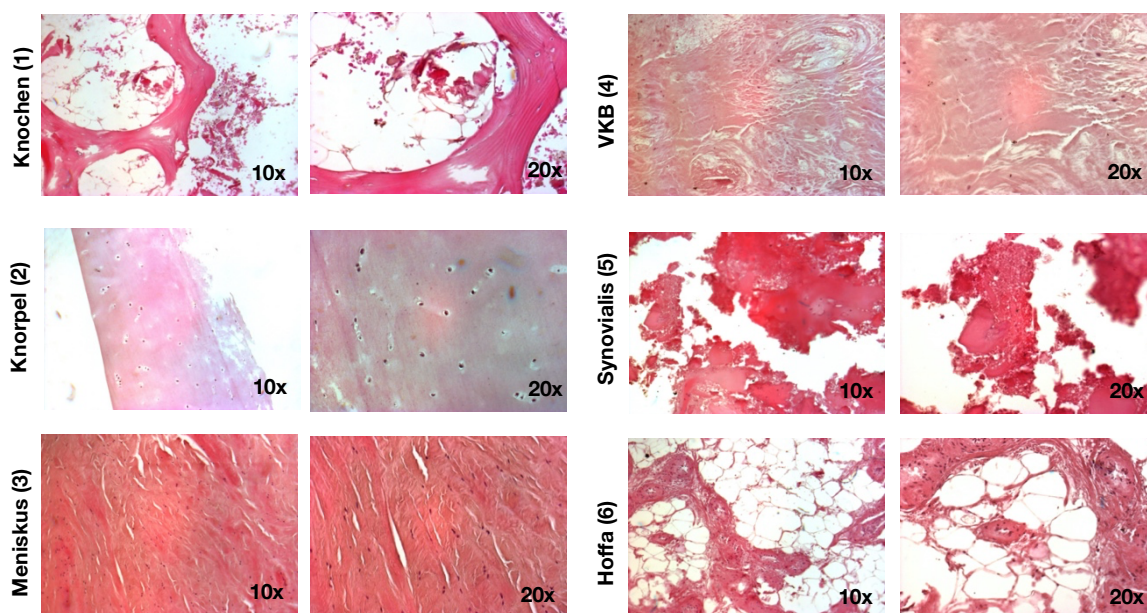


Abb. 1: 10- und 20-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der H&E-Färbung von Spongiosa des Femurs (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6).

Die mikroskopische Untersuchung eines Ausschnitts des Knochens (Abb. 1) zeigt die für Knochen typische Balkenstruktur mit Knochenplättchen. Dieses Stützgerüst wird von den Osteozyten und ihren langen Ausläufern gebildet. Die

basophilen Zellkerne sind dabei umgeben von minimalisierten Kollagenfasern, welche die EZM bilden. Knöcherne Strukturen weisen dabei einen hohen Anteil an Col I auf, welcher die Grundlagen für eine hohe Stabilität und Belastbarkeit des Gewebes schafft. Im Anschnitt lässt sich auch ein Teil der Spongiosa mit vereinzelt Zellen des blutbildenden Knochenmarks erkennen.

Abbildung zwei (2) zeigt einen Ausschnitt des hyalinen Knorpels. Dieser bedeckt sowohl die Femurkondylen, als auch die Gelenkflächen des Tibiaplateaus und die Rückseite der Patella. Für diese Arbeit stammt das Knorpelgewebe hauptsächlich vom Tibiaplateau. Zu erkennen sind die basophil gefärbten Kerne der Chondrozyten, um welche sich ein Hof von EZM befindet, welche die ovalen Chondrone bilden. Die basophile Anfärbung der EZM entsteht hierbei auf Grund des hohen Anteils an Proteoglykanen, welche als Wasserspeicher dienen und für die Elastizität des Knorpels sorgen. Die bindegewebigen Anteile des hyalinen Knorpels bestehen zum Großteil aus Col II sowie geringen Anteilen an den Kollagentypen IX und XI. Auffallend bei der Färbung ist die nur schwach ausgeprägte Basophilie der EZM, welche möglicherweise ein Hinweis darauf ist, dass eine Schädigung durch die Arthrose der Patientinnen bereits stattgefunden hat.

Bei den Abbildungen des Meniskus (3), des vorderen Kreuzbandes (VKB) (4), sowie bei der Synovialmembran (5) sieht man die basophilen Zellkerne umgeben von einer Vielzahl an Fibroblasten. Die Kollagenfasern dieser EZM bestehen zum Großteil aus dem straffen Col I, dessen Fasern sich in Zugrichtung ausrichten und so für die notwendige Stabilität sorgen.

Die Abbildung des Hoffa-Fettkörpers (6) zeigt die basophilen Zellkerne, sowie eine Vielzahl an Vakuolen, welche das Fett speichern. Das Fett wurde durch die Fixierung des Präparates ausgelöst, so dass das histologisch charakteristische Bild der leeren Vakuolen entsteht. Zusammenfassend betrachtet, zeigen sich bei der HE-Färbung der Gewebe keine größeren Auffälligkeiten oder Abweichungen zum normalen histologischen Bild dieser Gewebe.

#### **4.1.2 Wachstum und Morphologie der isolierten hMSCs**

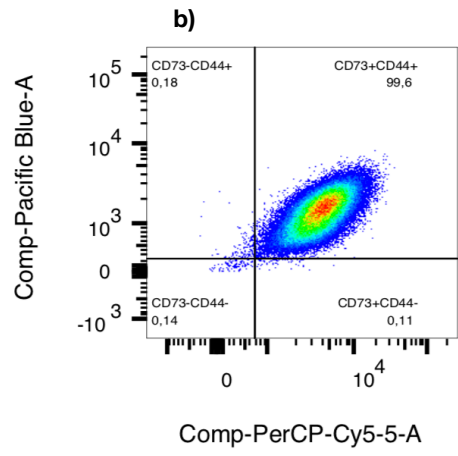
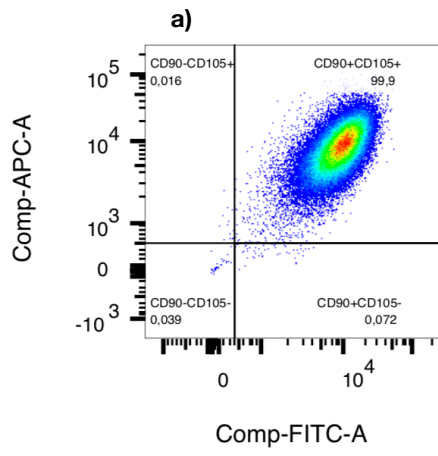
Im Anschluss an die Isolation der hMSCs aus den sechs verschiedenen Nativgeweben des Kniegelenkes, beschrieben in 2.2.1.1, wurden die Zellen, je nach Anzahl, in 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup> Polystyrene-Kulturflaschen ausgesät. Nach 2 Tagen waren ausreichend Zellen dabei adhärent, so dass der erste Mediumwechsel erfolgen konnte. Durch den alle zwei bis drei Tage erfolgenden Mediumwechsel wurden die nicht-adhären Zellen, sowie restliche Blutzellen ausgewaschen. Nach acht bis zehn Tagen waren die Zellkulturflaschen zu 80 - 90% konfluent bewachsen, so dass die Zellen abgelöst werden und in einer Konzentration von  $6,5 \times 10^6$  Zellen/1,5 mL Einfriermedium in Kryovials überführt und bei -80°C asserviert werden konnten. Bei nicht ausreichender Zellzahl konnten die Zellen auch passagiert werden, um ein erneutes Wachstum zu stimulieren. Für die Versuchsreihen wurden ausschließlich Primärkulturen und einmalig passagierte Kulturen verwendet.

#### **4.1.3 FACS-Analyse**

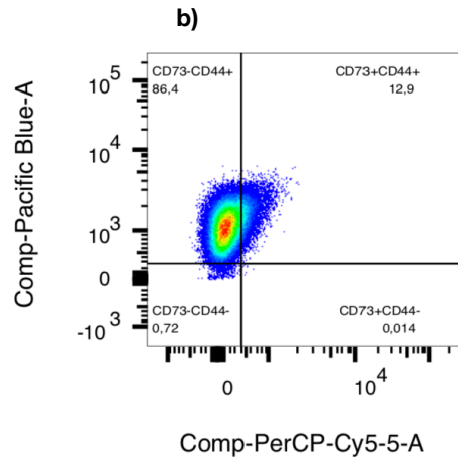
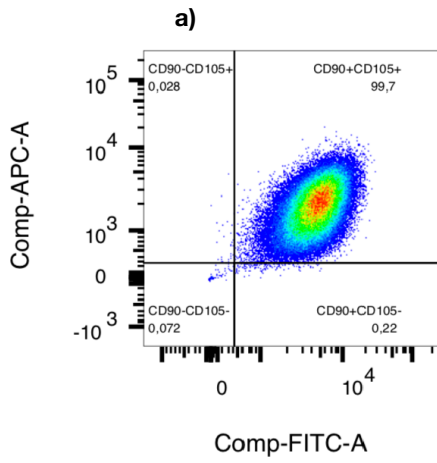
Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte automatisch mit Hilfe der FlowJo Software von FlowJo LLC. Zur optischen Darstellung wurden die Daten in je zwei Dot Plot Diagrammen dargestellt. Wie anhand der Daten ermittelt werden konnte, waren alle isolierten Zellen aller Gewebe zu mind. 98% positiv für CD90 und CD105. Auch CD44 war bei mind. 98% der Zellen aller sechs Gewebe positiv. Hingegen war die Expression von CD73 sehr unterschiedlich ausgeprägt. Während das Knochengewebe auch hier bei 99,6% ein positives Ergebnis zeigte, waren bei den aus dem Knorpelgewebe isolierten Zellen nur 12,9% CD73 positiv. Bei den Zellen des Meniskus waren es 58,1%, bei den Zellen des VKB 37,3%, bei den Zellen der Synovialmembran 51,7% und bei den Zellen des

Hoffa-Fettkörpers 36,1%. Da jedoch jeweils über 98% aller isolierten Zellen die, wie in 1.1.2 beschrieben, hMSC definierenden Marker CD90, CD105 und CD44 aufweisen, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den isolierten Zellen dieser Arbeit um hMSCs handelt.

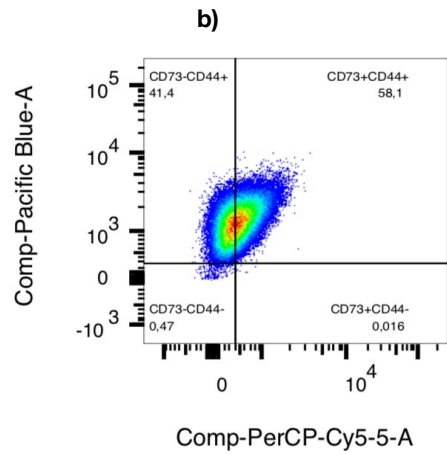
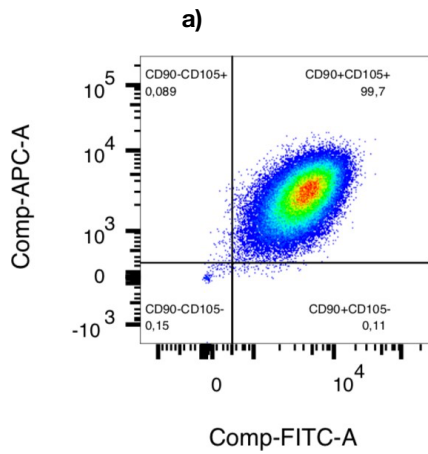
**Knochen (1)**



**Knorpel (2)**



**Meniskus (3)**





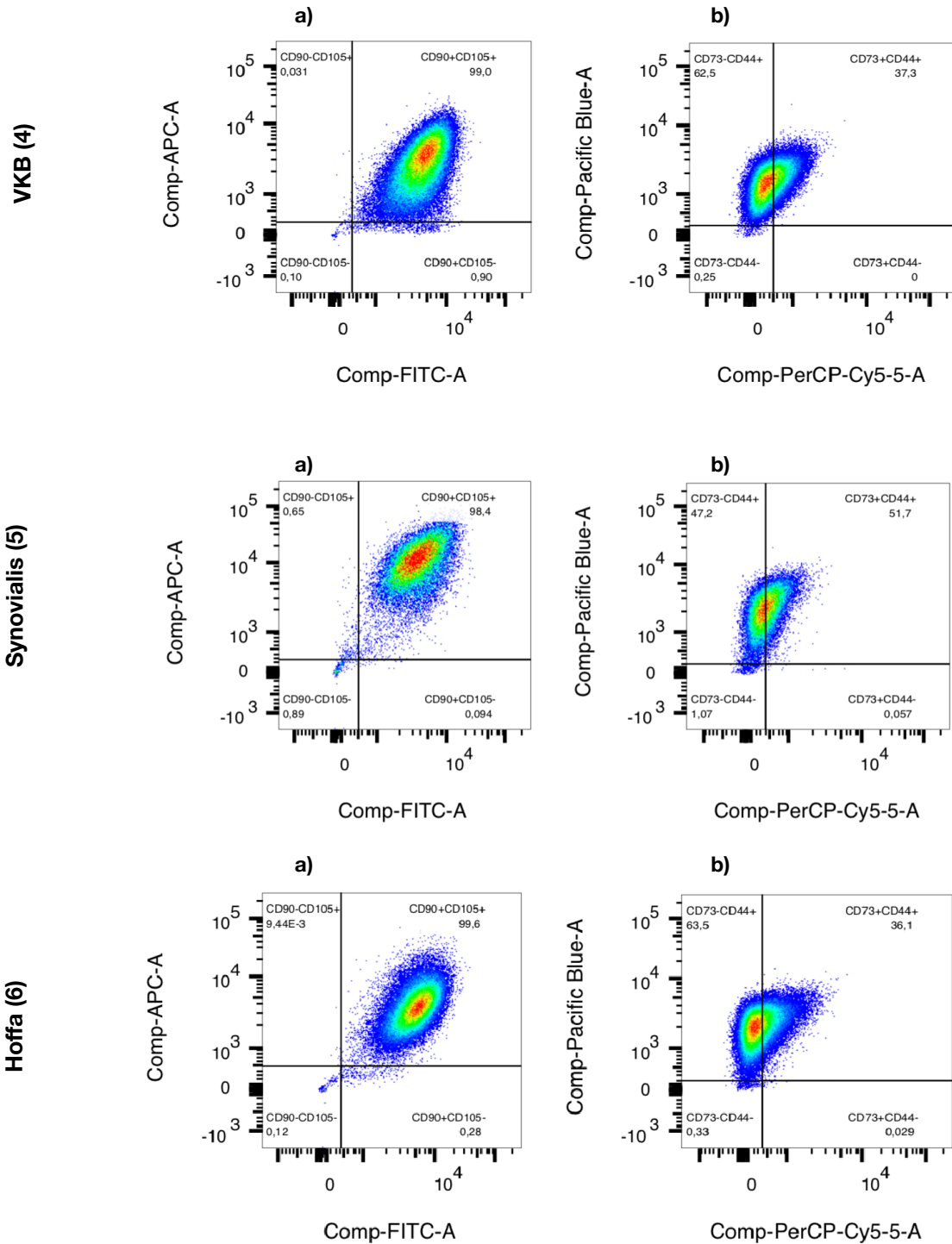


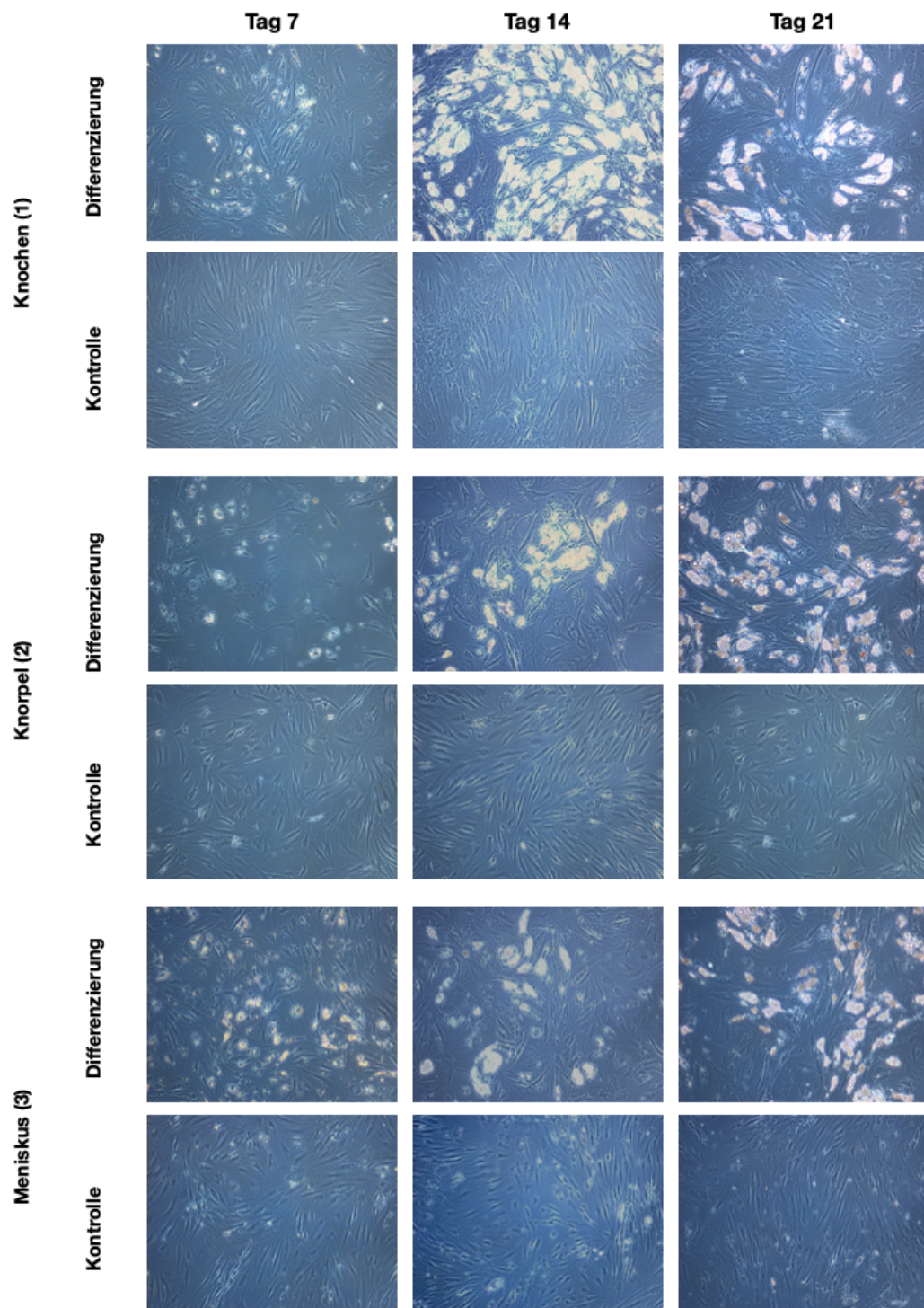
Abb. 2: Auswertung der FACS-Analyse der isolierten Zellen aus Spongiosa des Femurs (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6). a) zeigt dabei die Verteilung von CD90 & CD105, b) die Verteilung von CD73 & CD44.

## **4.2 Adipogene Differenzierung**

### **4.2.1 Unterschiede der einzelnen Gewebe im Rahmen der adipogenen Differenzierung**

Die adipogene Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen in einer Monolayerkultur. Dabei wurde pro Gewebe je eine 6-Well Platte mit je drei Wells zur Differenzierung und zur Kontrolle angelegt. Die Differenzierung erfolgte über ein adipogenes Differenzierungsmedium, während die Negativkontrolle mit einem Kontrollmedium versehen wurden. Das Wachstum der Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten kontrolliert. Dabei konnte bei allen Zellen, die mit dem Differenzierungsmedium versehen wurden, die Ausbildung von wahrscheinlich lipidhaltigen Vesikeln beobachtet werden.

Während dies am Anfang noch recht langsam erfolgte, waren die Vesikel am Ende der 21 Tage recht deutlich ausgeprägt. Obwohl alle Gewebe mikroskopisch Zeichen der adipogenen Differenzierung zeigen, ist zu erkennen, dass das vordere Kreuzband und der Hoffa Fettkörper ein dichteres Vesikelvorkommen aufweisen als die anderen vier Gewebearten. Besonders die Synovialmembran weist optisch eine geringere Vesikeldichte auf. Bei den Kontrollen bildeten die Zellen hingegen keine Vesikel aus, sondern wuchsen erneut aus bis zum Erreichen der Konfluenz.



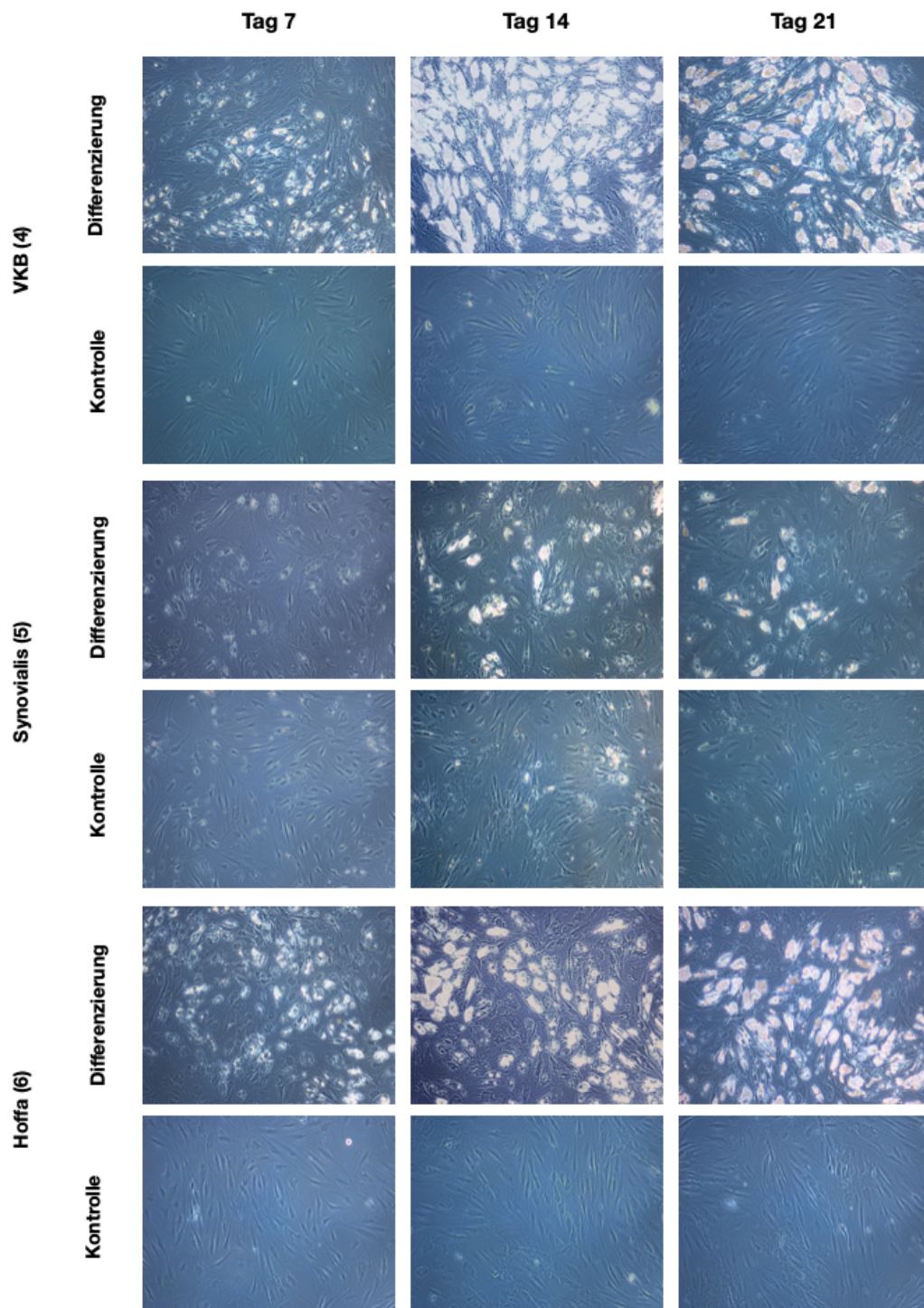


Abb. 3: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung des Wachstums an Tag 7, 14 und 21 der isolierten mesenchymalen Stromazellen aus Spongiosa des Femurs (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6) im Rahmen der adipogenen Differenzierung und der dazugehörigen Negativkontrollen.

#### **4.2.2 Oil-RedO-Färbung**

Zum Nachweis, dass die ausgebildeten Vesikel lipidgefüllt sind, wurde eine Oil-Red-Färbung durchgeführt. Bei dieser wird das intrazelluläre eingespeicherte Lipid rot angefärbt. Neben dem Nachweis der Bildung von Lipid, kann auch ein quantitativer Unterschied der adipogenen Differenzierung gegenüber der Negativkontrollen aufgezeigt werden.

Anhand der Rotfärbung der intrazellulären Vakuolen kann man erkennen, dass es sich hierbei um lipidspeichernde Vakuolen handelt. Bei allen sechs Gewebetypen ist dabei eine positive adipogene Differenzierung zu erkennen. Allerdings lässt sich ein quantitativer Unterschied, vor allem im Vergleich zu den Zellen des Hoffa-Fettkörpers erkennen. Des Weiteren zeigt die fehlende Färbung in der Kontrolle, dass es bei der Negativkontrolle zu keinerlei adipogener Differenzierung gekommen ist.

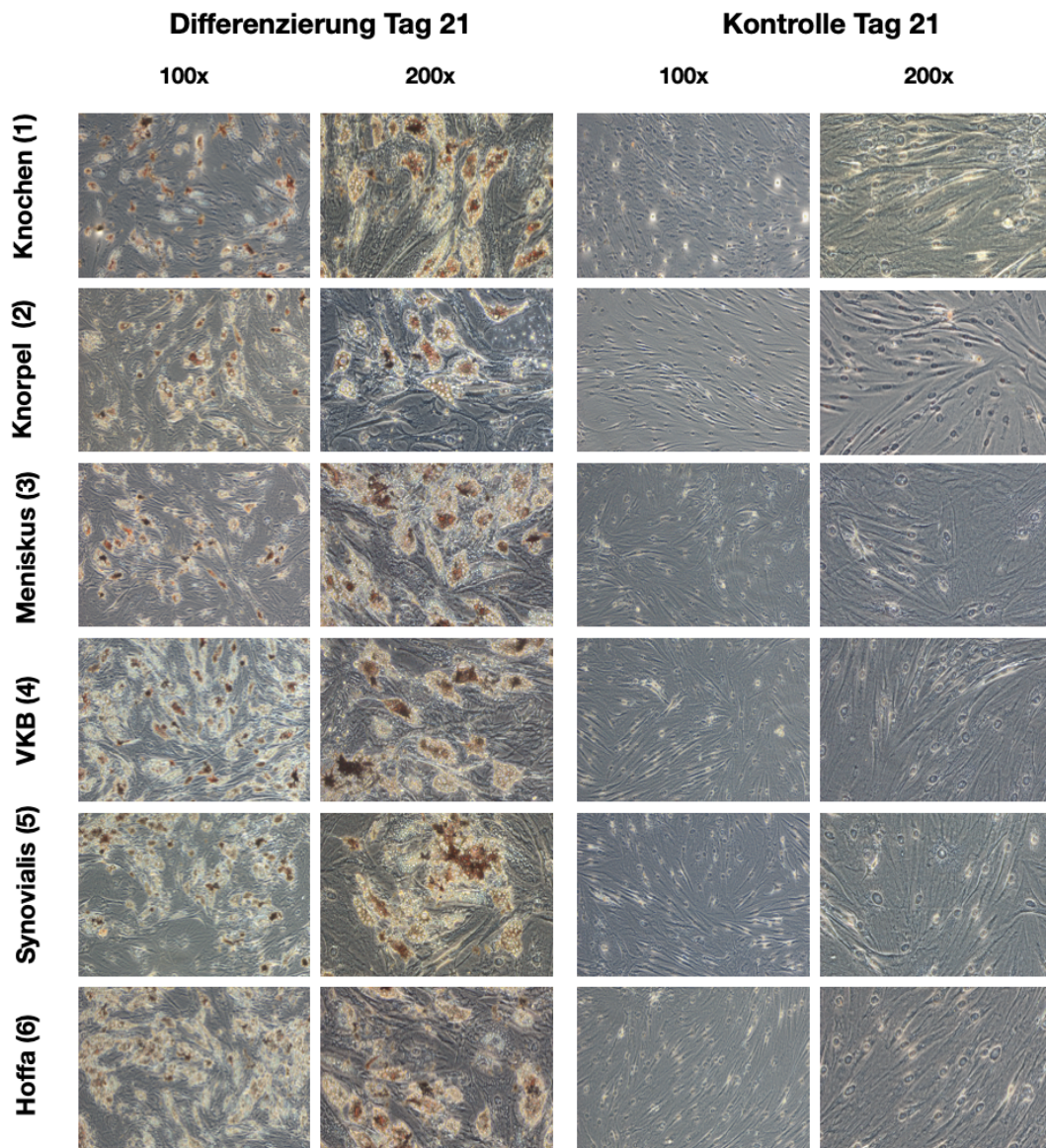
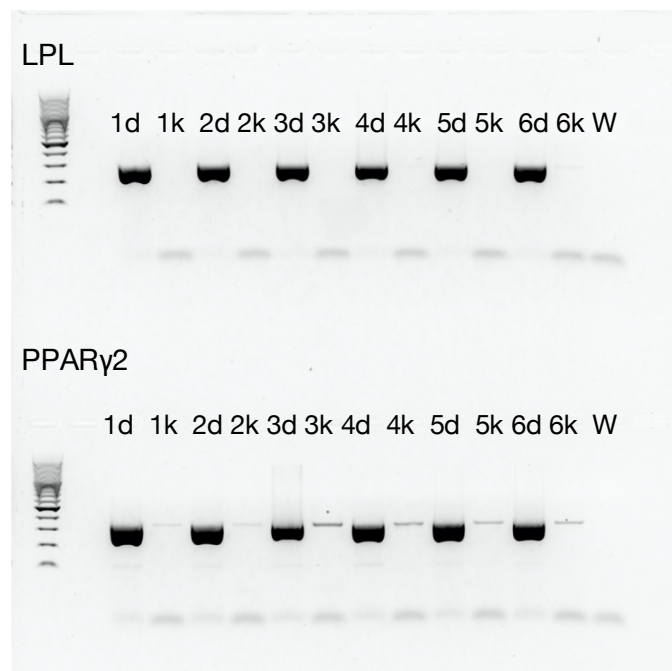


Abb. 4: 100- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Oil-Red-O-Färbung und der dazugehörigen Negativkontrollen von Spongiosa des Femurs (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6) an Tag 21 der adipogenen Differenzierung.

### 4.2.3 Semiquantitative PCR-Analyse von adipogenen Markergenen

Um zu überprüfen, ob sich neben den mikroskopischen Veränderungen der Zellen auch eine Veränderung auf molekulargenetischer Ebene bei der adipogenen Differenzierung vollzogen hat, wurde eine semiquantitative PCR-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auf die Expression der adipogenen Markergene Lipoproteinlipase (LPL), sowie auf den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor  $\gamma$  2 (PPAR $\gamma$ 2) untersucht. Bei LPL handelt es sich um ein wasserlösliches Enzym, welches zur Aufspaltung von Triacylglyceriden dient. Es kommt beim Menschen in den Fettzellen vor und spielt eine entscheidende Rolle im Fettstoffwechsel. PPAR $\gamma$ 2 ist ein Rezeptor, welcher bekanntermaßen hauptsächlich in den Fettzellen vorkommt [61]. Er spielt, wie bereits in 1.2.1 beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Einlagerung von Fettsäuren und bei der Adipogenese. Des Weiteren ist PPAR $\gamma$ 2 ein Regulatorgen der adipogenen Differenzierung.

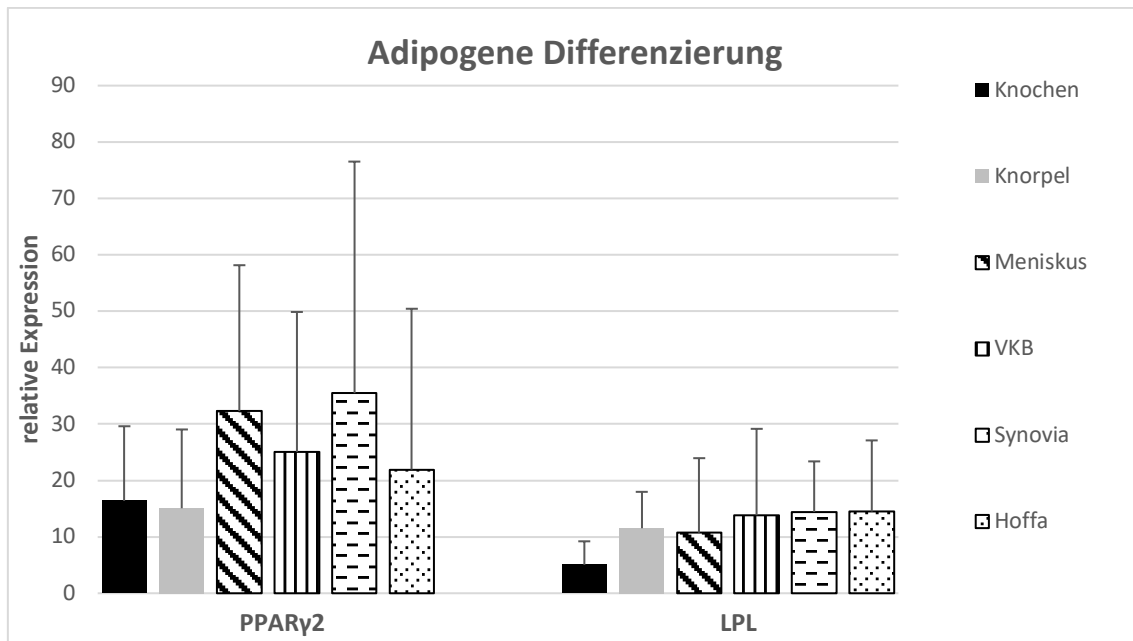
Nach der semiquantitativen PCR wurden die Proben mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht und anschließend densitometrisch quantifiziert. Es wurde dabei der Vergleich zwischen der Expression der Marker LPL und PPAR $\gamma$ 2 zwischen den Differenzierungen und den dazugehörigen Negativkontrollen gezogen. Dies erlaubte die Erfassung einer möglichen quantitativen Expressionsverstärkung der Gene.



**Abb. 5: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR Produkte der adipogenen Markergene LPL und PPAR $\gamma$ 2. Erkennbar sind die Banden der Differenzierungen (1d-6d), sowie der zugehörigen Kontrollen (1k-6k). Des Weiteren ist eine Wasserprobe (W) abgebildet.**

Wie eindeutig zu erkennen ist, zeigen die differenzierten Zellen eine deutliche Steigerung der Expression von LPL und PPAR $\gamma$ 2 im Vergleich zu den jeweiligen Negativkontrollen. Es muss davon ausgegangen werden, dass eine adipogene Differenzierung stattgefunden hat. Um die einzelnen Gewebe auch unterhalb der Spenderinnen vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse aller Spenderinnen statistisch zusammengefasst und nach ihrem Mittelwert aufgetragen. Zusätzlich wurde auch die Standardabweichung angegeben.





**Abb. 6: Densitometrische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression der Markergene PPAR $\gamma$ 2 und LPL der adipogenen Differenzierung, welche mit Hilfe der semiquantitativen PCR innerhalb der sechs Gewebe des Kniegelenkes ermittelt wurden.**

Wie anhand der Balkendiagramme ersichtlich wird, ist die Expression der adipogenen Markergene in den einzelnen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt. Dabei ist zu erkennen, dass alle sechs Gewebe im Vergleich zu den Negativkontrollen, mit welchen die Werte vor Mittelwertbestimmung in Relation gesetzt wurden, eine deutlich stärkere Expression zeigen. Vor allem die vier weicheren Gewebe, Hoffa-Fettkörper, vorderes Kreuzband, Synovialmembran und Meniskus zeigen dabei eine deutliche Expression von PPAR $\gamma$ 2. Die festeren Gewebe, Knochen und Knorpel, zeigen zwar ebenfalls eine deutliche Steigerung gegenüber den Negativkontrollen, allerdings eine geringfügig schwächere Expression als die anderen Gewebe. Bei der Expression von LPL zeigt sich eine eher geringe Expression bei den hMSCs des Knochengewebes. Die Zellen des vorderen Kreuzbandes, der Synovialmembran und des Hoffa-Fettkörpers zeigen hierbei die höchste Expression, während der Knorpel und Meniskus eine Zwischenstellung einnehmen. Alle Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

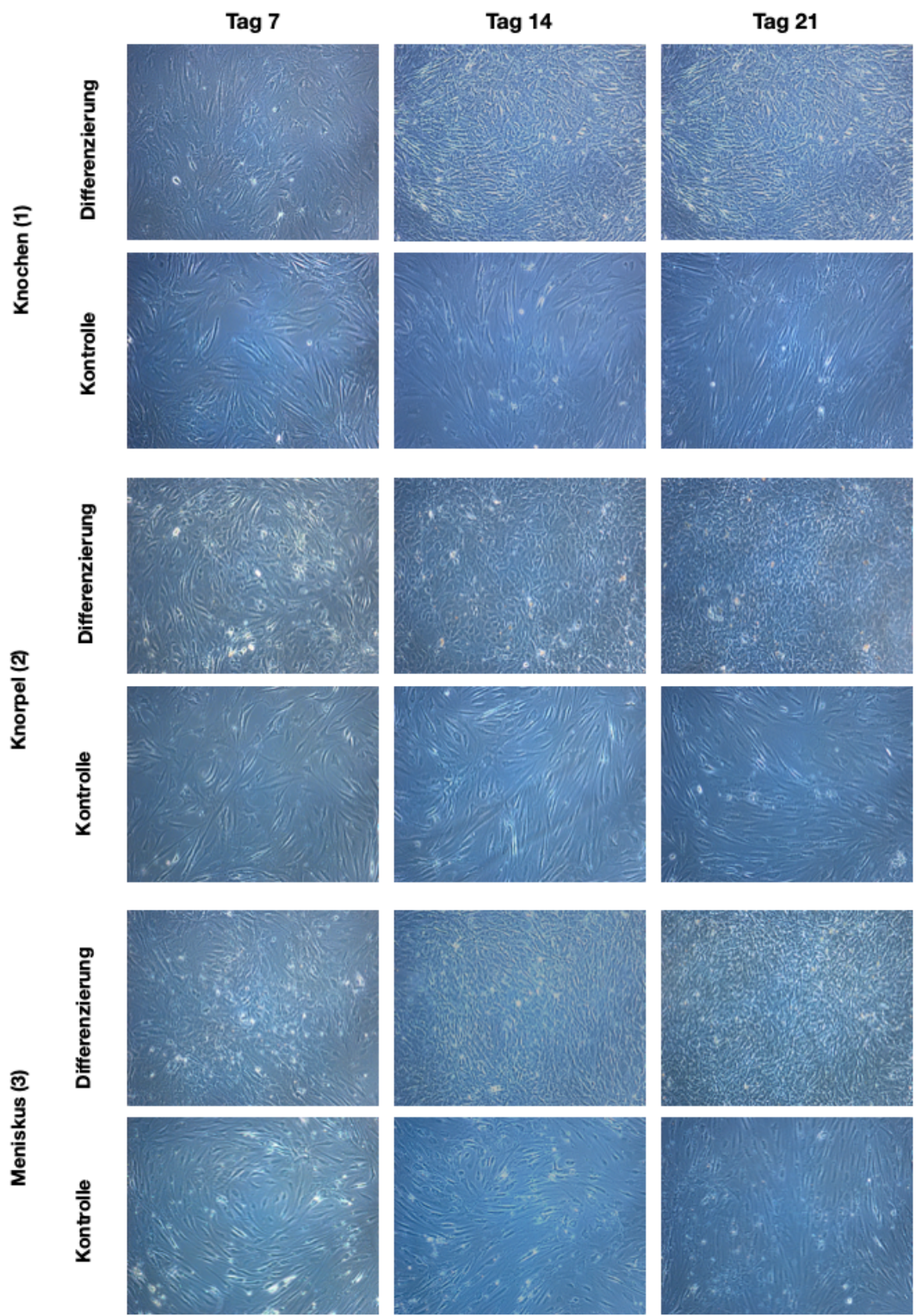
### **4.3 Osteogene Differenzierung**

#### **4.3.1 Unterschiede der einzelnen Gewebe im Rahmen der osteogenen Differenzierung**

Die osteogene Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen in einer Monolayerkultur. Dabei wurde pro Gewebe je eine 6-Well Platte mit je drei Wells zur Differenzierung und zur Kontrolle angelegt. Des Weiteren wurde pro Gewebe eine Chamberslide mit 4 Kammern angelegt. Bei den Chamberslides dienten zwei Kammern zur Differenzierung und zwei zur Kontrolle. Die Differenzierung erfolgte über ein osteogenes Differenzierungsmedium, während die Negativkontrolle mit einem Kontrollmedium versehen wurde. Das Wachstum der Zellen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten kontrolliert. Während der Differenzierungsperiode konnte bei allen Zellen, welche mit dem osteogenen Differenzierungsmedium behandelt wurden, die Ausbildung von organisierten Zelleinheiten mit langen Ausläufern beobachtet werden. Bereits ab Tag 14 zeigten die Zellen deutlich mehr Zell-Zell-Kontakte als die Kontrollen. Bis zu Tag 21 wurden diese noch deutlicher und es bildete sich ein spinnennetzartiges Erscheinungsbild. Um die Ausläufer herum zeigen sich deutliche Aufhellungen als Anzeichen von Ablagerungen in der EZM. Durch die große Anzahl an Zellkontakten und die ausgebildeten Strukturen der Zellen, lässt das Bild an das Trabekelnetzwerk von Knochen denken. Auffällig ist dabei allerdings, dass die Zellen der Synovialmembran und des Hoffa-Fettkörpers eine sichtlich lockere Zellkontaktstruktur aufweisen, als insbesondere die Zellen des Knochens und des Knorpels. Bei den negativen Kontrollen wuchsen die Zellen zwar auch zur Konfluenz, allerdings geschah dies wie für die hMSCs typisch in unorganisierten Strukturen, mit multiplen Ausläufern.

Auf Grund dieser unterschiedlichen Zellorganisation kann man einen ersten Hinweis gewinnen, dass bei den Zellen durch den Einfluss des Differenzierungsmediums ein Wachstumsstimulus in Richtung einer osteogenen Differenzierung erfolgt ist. Zur weiteren Verifizierung der

osteogenen Differenzierung erfolgten anschließend noch weitere histochemische sowie molekularbiologische Untersuchungen der Zellen.



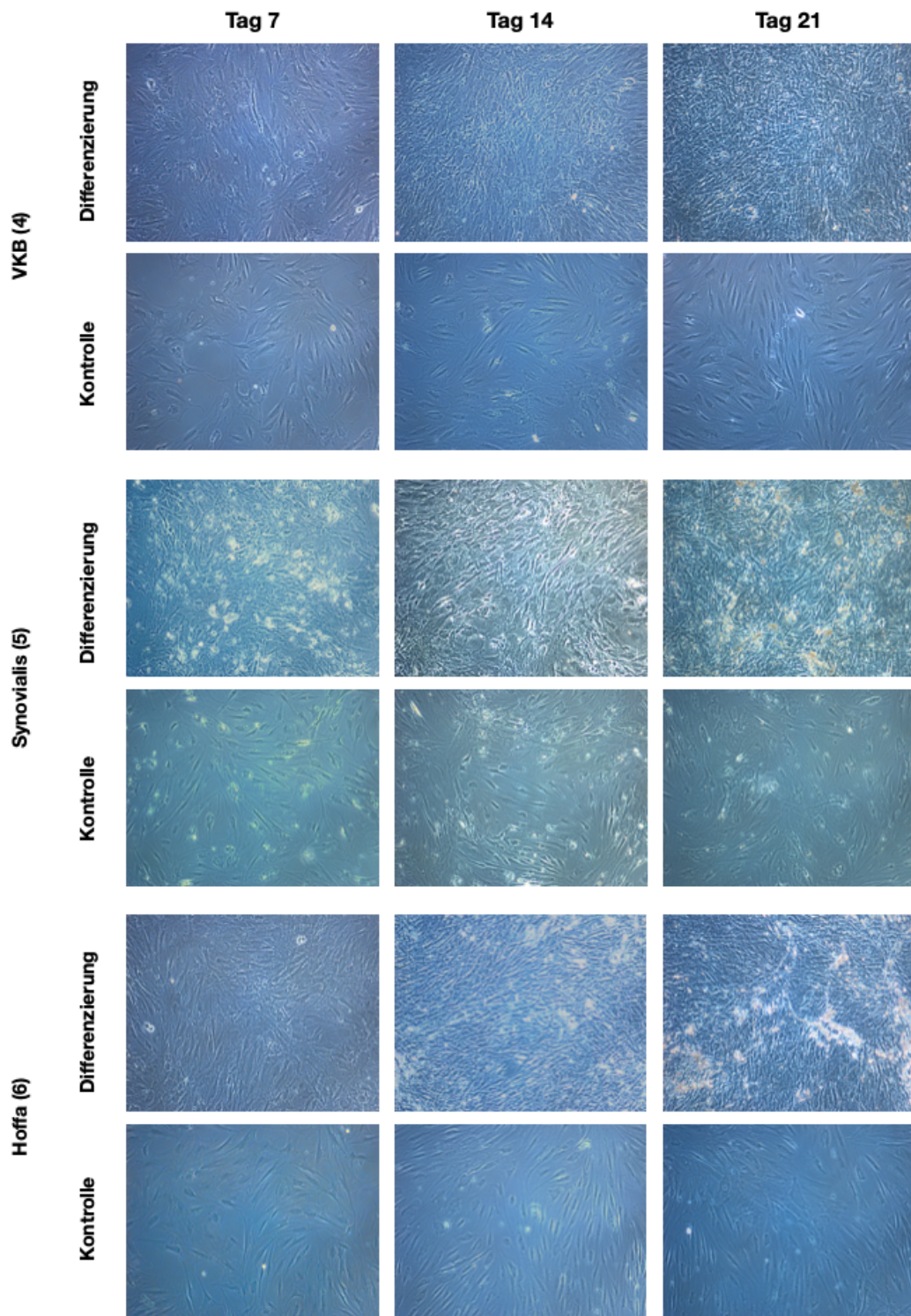


Abb. 7: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung des Wachstums an Tag 7, 14 und 21 der isolierten mesenchymalen Stromazellen aus Spongiosa des Femurs (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6) im Rahmen der osteogenen Differenzierung und der dazugehörigen Negativkontrollen.

### 4.3.2 Alizarin Rot S-Färbung von Monolayerkulturen

Bei der Alizarin Rot S Färbung handelt es sich um eine chemische Komplexbildung mit Calcium-Ionen, welche dann zu einer Rotfärbung führt. Da Hydroxylapatit-Kristalle, welche einen großen Teil der ossären EZM ausmachen, Calcium-Ionen enthalten, deutet eine positive Färbung auf eine osteogene Differenzierung der Zellen mit Ausbildung einer ossären EZM hin. Insbesondere im Vergleich zu den Negativkontrollen kann so ein Hinweis auf die ossäre Differenzierung der hMSC-Monolayerkulturen gewonnen werden. Eindeutig zu erkennen ist, dass die Negativkontrollen im Gegensatz zu den differenzierten hMSCs keine Färbung zeigen. Bei den Zellen, die einem Differenzierungsreiz ausgesetzt waren, kann man, wie schon bei den nativen Bildern, erkennen, dass diese sich in Zellstrukturen organisiert haben. Dabei sind die Bereiche der EZM, welche vorher hell erschienen, nun durch die Färbung rot dargestellt. Dadurch kann der Schluss gezogen werden, dass eine calciumhaltige EZM durch die Zellen aufgebaut wurde. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass es im Rahmen der Differenzierungen zu einem Aufbau osteogener Strukturen gekommen ist. Bei genauerer Betrachtung der rot gefärbten Bereiche lässt sich erkennen, dass diese bei den Zellen aus Knochen und Knorpel größer erscheinen und gleichmäßiger verteilt sind, als vor allem im Vergleich zu den Zellen des vorderen Kreuzbandes, des Meniskus und der Synovialmembran. Interessanterweise sind die Zellen des Hoffa-Fettkörpers optisch auch gleichmäßiger verteilt, allerdings größentechnisch kleiner und spärlicher als bei den hMSCs des Knochens und Knorpels.

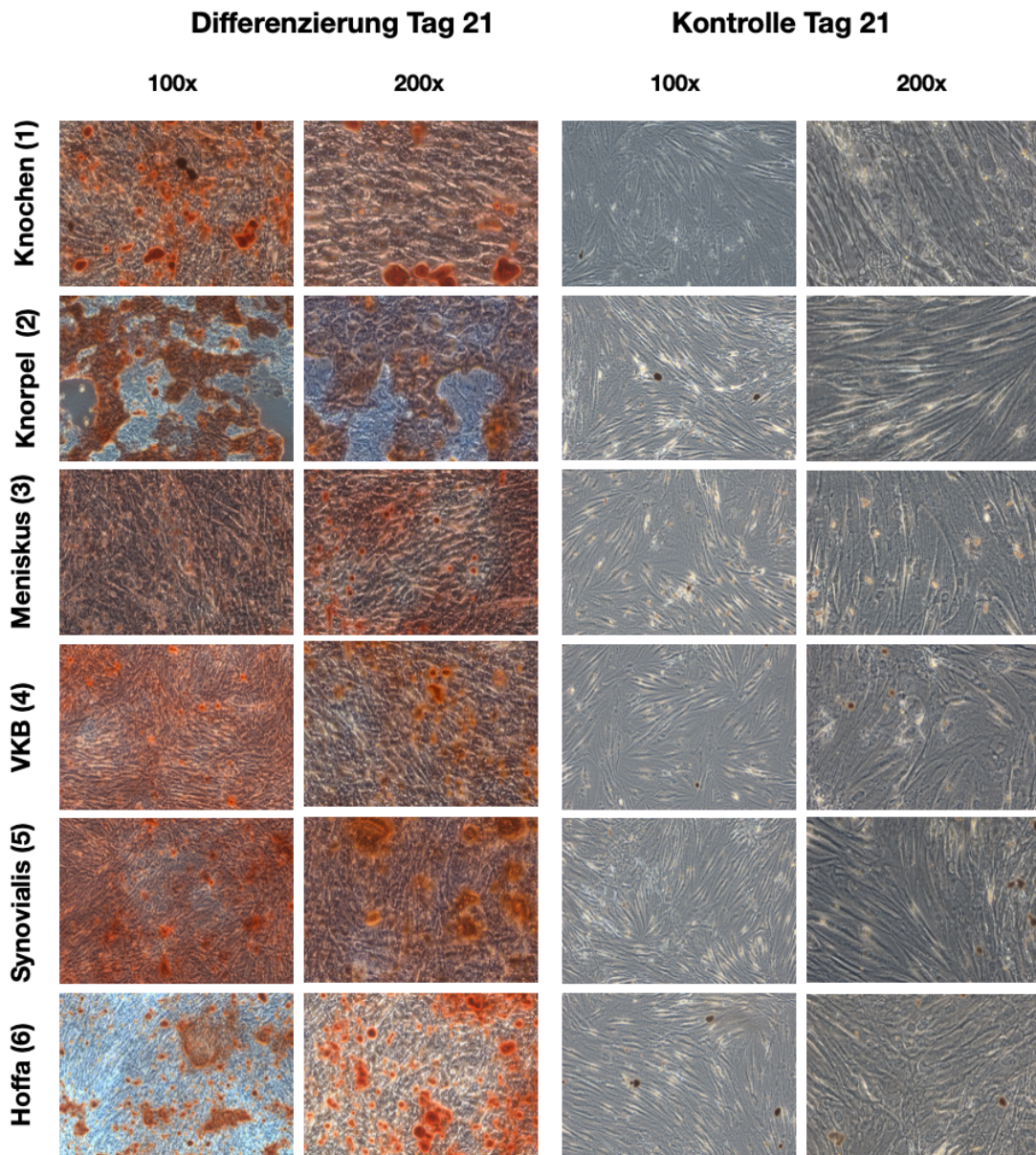


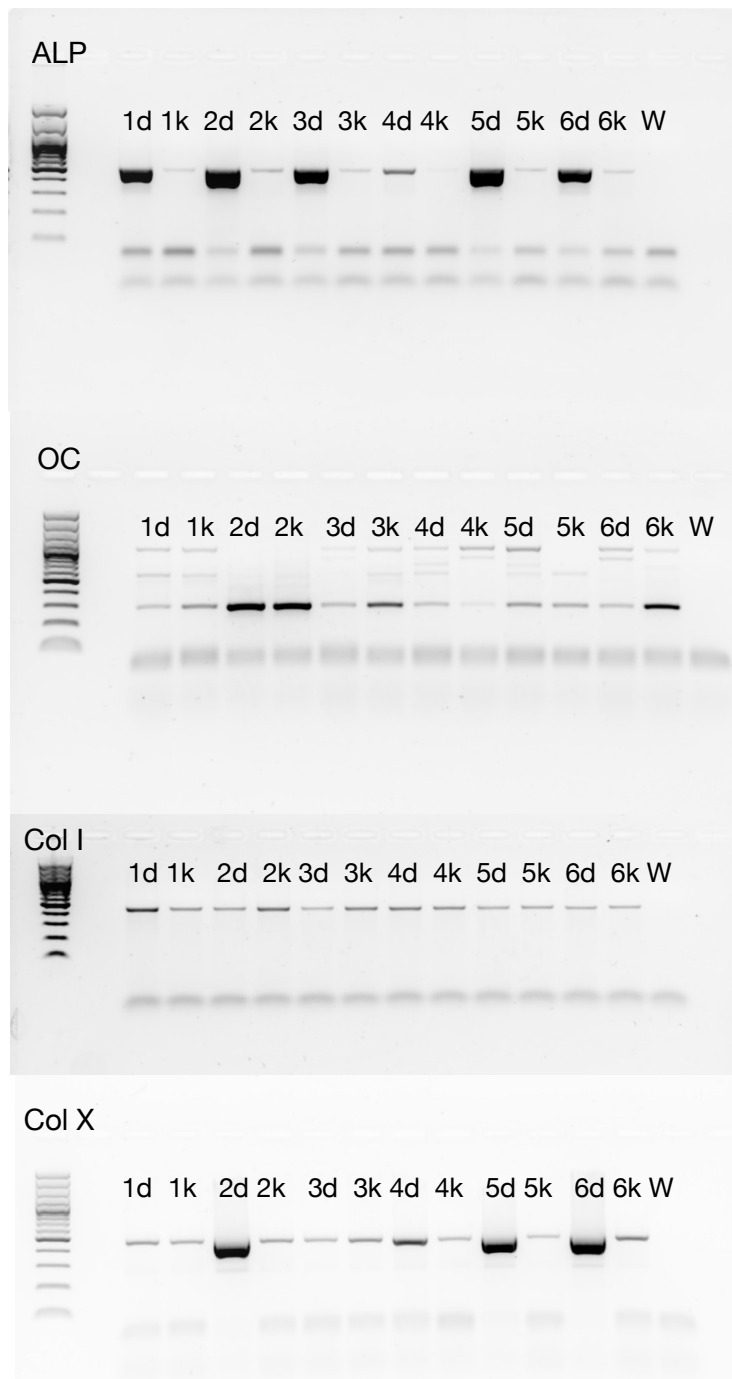
Abb. 8: 100- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Alizarin Rot-Färbung und der dazugehörigen Negativkontrollen von Spongiosa des Femur (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6) an Tag 21 der osteogenen Differenzierung.

### 4.3.3 Semiquantitative PCR-Analyse von osteogenen Markergenen

Um zu überprüfen, ob sich neben den mikroskopischen Veränderungen der Zellen auch eine Veränderung auf molekulargenetischer Ebene bei der osteogenen Differenzierung vollzogen hat, wurde eine semiquantitative RT-PCR-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auf die Expression der osteogenen Markergene Alkalische Phosphatase (ALP), auf Osteocalcin (OC), sowie auf die Col I und Col X getestet. Bei ALP und OC handelt es sich um zwei Moleküle, welchen einen großen Einfluss auf die osteogene Differenzierung haben. ALP kommt dabei im Körper in verschiedenen Isoenzymen vor. Im Bereich des Knochens sorgt es durch eine Hydrolisierung von Phosphatverbindungen für die Mineralisation des Knochengewebes. OC ist hingegen ein Peptidhormon und bedingt maßgeblich die hohe Anzahl der Calciumbindungen in der knöchernen extrazellulären Matrix. Bei Col I handelt es sich, wie bereits beschrieben, um den Hauptvertreter der faserbildenden Kollagentypen im Knochengewebe. Dabei sorgt das Col I für die Zugfestigkeit der Trabekelstrukturen des Knochengerüsts. Col X spielt hingegen vor allem in der Ossifikation des Knochengewebes eine Rolle. Im menschlichen Körper kommt es insbesondere in den Wachstumszonen des fetalen Knochengewebes vor.

Nach der semiquantitativen RT-PCR wurden die Proben mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht und anschließend densitometrisch quantifiziert. Es wurde dabei der Vergleich zwischen der Expression der vier Marker ALP, OC, Col I und Col X zwischen den Differenzierungen und den dazugehörigen Negativkontrollen gezogen. Dieser Vergleich erlaubte die Erfassung einer, durch die Differenzierung angeregten, möglichen quantitativen Expressionsverstärkung der Gene. Durch den Vergleich mit den jeweiligen Negativkontrollen ist zu erkennen, dass die differenzierten Zellen eine Expressionsteigerung in den Markergenen zeigen.

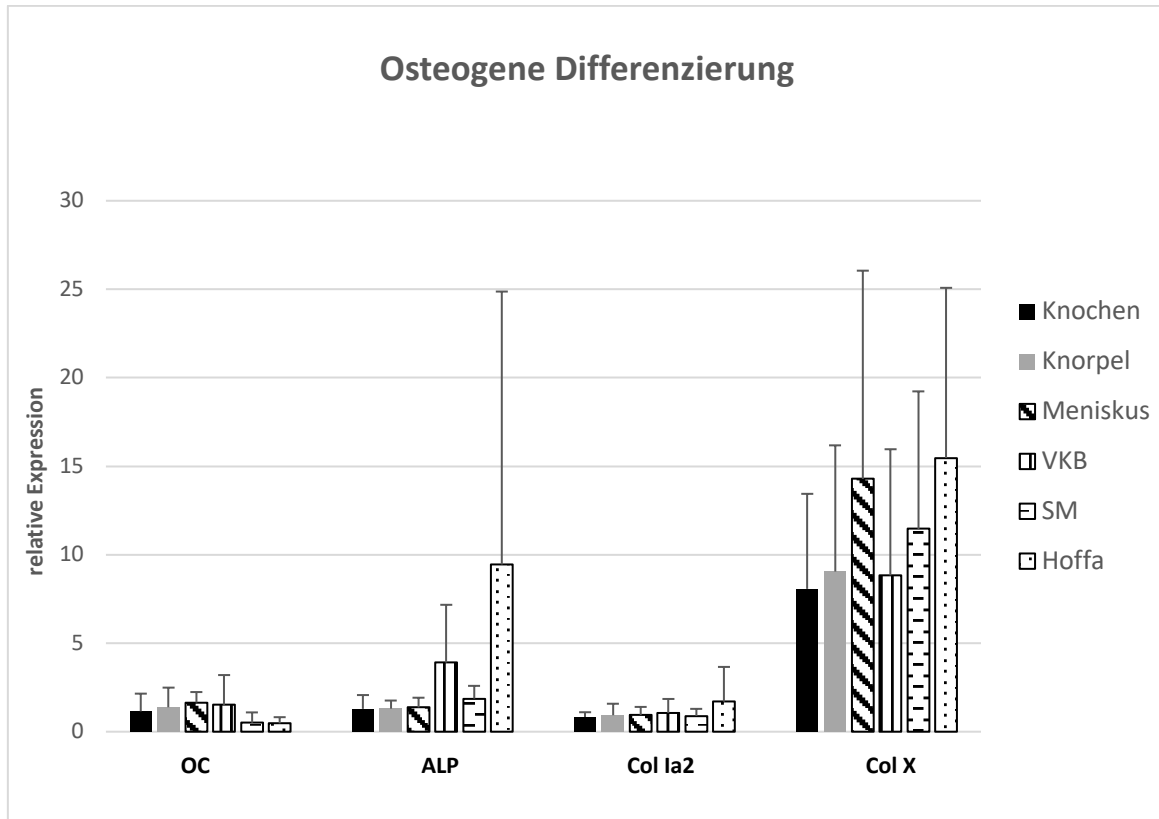




**Abb. 9: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR Produkte der osteogenen Markergene ALP, OC, Col I und Col X. Abgebildet sind die Banden der Differenzierungen (1d-6d), sowie der zugehörigen Kontrollen (1k-6k). Des Weiteren ist eine Wasserprobe (W) abgebildet.**

Es muss davon ausgegangen werden, dass eine osteogene Differenzierung stattgefunden hat. Um die einzelnen Gewebe auch unterhalb der Spenderinnen vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse alle Spenderinnen statistisch

zusammengefasst und nach ihrem Mittelwert aufgetragen. Zusätzlich wurde auch die Standardabweichung miterfasst.



**Abb. 10: Densitometrische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression der Markergene Osteocalcin, ALP, Col 1a2 und Col X der osteogenen Differenzierung, welche mit Hilfe der semiquantitativen PCR innerhalb der sechs Gewebe des Kniegelenkes ermittelt wurden.**

Bei allen vier Markergenen zeigt sich bei der osteogenen Differenzierung ein recht durchmischtes Bild. Schon bei den Banden der Agarose-Gel-Elektrophorese zeigt sich insbesondere bei Col I kein großer Unterschied zwischen den Banden der Differenzierung und der Kontrollen. Auch bei der statistischen Auswertung bewegen sich die Werte alle in einem Bereich unter oder von 1, so dass es keinen großen Unterschied in der Expression durch die Differenzierung gegeben hat. Einzig bei den Zellen des Hoffa-Fettkörpers scheint eine geringe Expression von Col I vorhanden zu sein. Ebenfalls ist die Expression von OC bei den hMSCs der Synovialmembran und des Hoffa-Fettkörpers eher

gering ausgeprägt. Auch die Expression von ALP und Col X ist bei diesen Zellen am größten ausgeprägt, allerdings ist auch die Standardabweichung bei den Zellen dieses Gewebes am größten. Insgesamt zeigen die weicheren Gewebe eine geringfügig stärkere Ausprägung der Markergene als die hMSCs des Knochen- und Knorpelgewebes. Die stärkste Expression zeigen alle Zellen bei den Markergenen ALP und Col X. Insgesamt waren alle Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant.

#### **4.4 Chondrogene Differenzierung**

##### **4.4.1 Chondrogenen Differenzierung in Pelletkulturen**

Die chondrogene Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von 28 Tagen in Form von Pelletkulturen. Dabei wurde pro Gewebe je vier Pellets zur Differenzierung und zur Kontrolle angelegt. Dies erfolgte in 15mL-Tubes. Die Differenzierung erfolgte über ein chondrogenes Differenzierungsmedium, während die Negativkontrolle auch hier mit einem Kontrollmedium versehen wurden. Auf Grund der Anlage von Pelletkulturen konnte das Wachstum der Zellen nicht zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilt werden. Es erfolgte jedoch nach der Differenzierung die Anfertigung von Kryoschnitten, welche dann histochemisch und immunhistochemisch behandelt wurden. Des Weiteren wurde ein Teil der Pellets lysiert und molekulargenetisch untersucht.

#### **4.4.2 Alcian Blau-Färbung der Pelletkulturen**

Im Rahmen der Alcian Blau-Färbung werden Proteoglykane blau angefärbt. Diese hydrophilen Moleküle bilden einen Großteil der EZM des hyalinen Knorpelgewebes und fördern durch ihre wasserbindende Wirkung die Puffereigenschaften des Knorpelgewebes. Wie anhand der Aufnahmen zu erkennen ist, zeigte sich bei allen sechs differenzierten Geweben eine deutliche Färbung dieser. Bei den jeweiligen Negativkontrollen zeigte sich zwar auch eine leichte Färbung, allerdings ist diese bei den Kontrollen recht schwach und lässt somit, im Gegensatz zu den deutlich gefärbten differenzierten Proben, keinen Rückschluss auf eine wesentliche chondrogene Differenzierung zu. Insbesondere die intensive Blaufärbung der differenzierten hMSCs des Knorpelgewebes lässt auf eine gelungene chondrogene Differenzierung schließen. Während die restlichen differenzierten Gewebe ebenfalls eine deutliche Färbung aufweisen, lässt sich bei genauerer Betrachtung der Zellanordnung erkennen, dass trotz des positiven Nachweises von Proteoglykanen nur der Aufbau der Spongiosa und Knorpelzellen an die histologische Form von humanen Knorpelgewebe erinnert. Im Gegensatz zu den Zellen der Weichgewebe, zeigen diese beiden Gewebe, insbesondere im Randbereich der Pellets den klassischen Aufbau der Chondrone, welche man auch in nativem Knorpelgewebe findet. Die anderen vier Gewebe scheinen zwar Proteoglykane aufzubauen, jedoch erscheint die Anordnung der Zellen recht willkürlich.

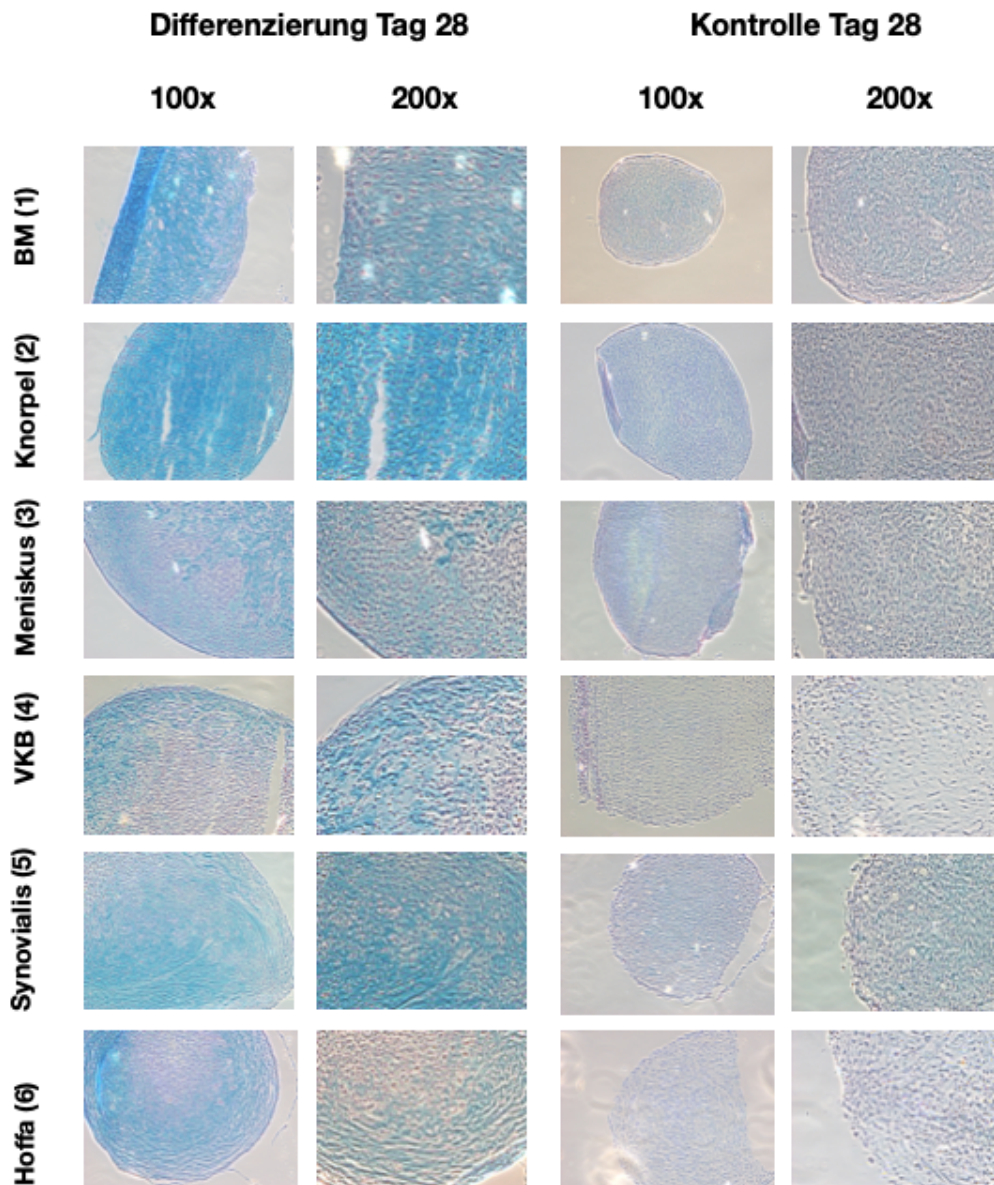


Abb. 11: 100- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Alcian Blau-Färbung und der dazugehörigen Negativkontrollen von Spongiosa des Femurs (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6) an Tag 28 der chondrogenen Differenzierung.

#### **4.4.3 Immunhistochemische Färbung der chondrogenen Markergene Kollagen Ila1 und Kollagen X**

Neben der Alcian Blau-Färbung wurde zur weiteren Beurteilung der chondrogenen Differenzierung eine immunhistochemische Färbung der Markergene Col II und Col X durchgeführt. Bei dem Col II handelt es sich dabei um den am häufigsten anzutreffenden Kollagentyp des hyalinen Knorpelgewebes. Bei der Betrachtung der phasenmikroskopischen Aufnahmen ist eine bräunliche Färbung als positiver Nachweis der immunhistochemischen Färbung von Col II anzusehen. Zu erkennen ist diese Färbung in einem recht gleichmäßigen Muster innerhalb des Pellet bei den differenzierten hMSCs des Knochens und Knorpels. Bei den anderen Geweben lässt sich eine eher punktförmige Expression von Col II erkennen. Im Gegensatz zu den differenzierten Zellen zeigen die jeweiligen Negativkontrollen jedoch keinen positiven Nachweis in der immunhistochemischen Färbung von Col II.

Die zweite immunhistochemische Färbung erfolgte bei der Färbung von Col X. Dabei handelt es sich im Knorpelgewebe um einen Hypertrophiemarker des chondrogenen Wachstums. Eine positive Expression zeigt sich auch hier wieder in einer bräunlichen Färbung. Zu erkennen ist eine Expression des Markers in allen sechs Geweben. Dabei ist festzustellen, dass die positiv gefärbten Areale insbesondere in den zentralen Bereichen der Pelletkultur zu finden sind. Die Randbereiche hingegen zeigen eine, wenn nur geringe, Expression des Markers. Auch bei dieser Färbung zeigt sich bei den Negativkontrollen keine nennenswerte Expression. Der Farbstreifen, der sich innerhalb der Kontrolle der Synovialmembran zeigt, scheint am ehesten einem Färbeartefakt zu entsprechen, welcher durch eine Überlappung der Struktur innerhalb der Pellets beim Auftragen auf den Objektträger entstanden ist. Bei der Färbung ist zu erkennen, dass diese insbesondere bei den Zellen des Knochens und des Hoffa-Fettkörpers recht intensiv ist. Auch die anderen Gewebe zeigen eine deutliche Expression des Hypertrophiemarkers Col X.

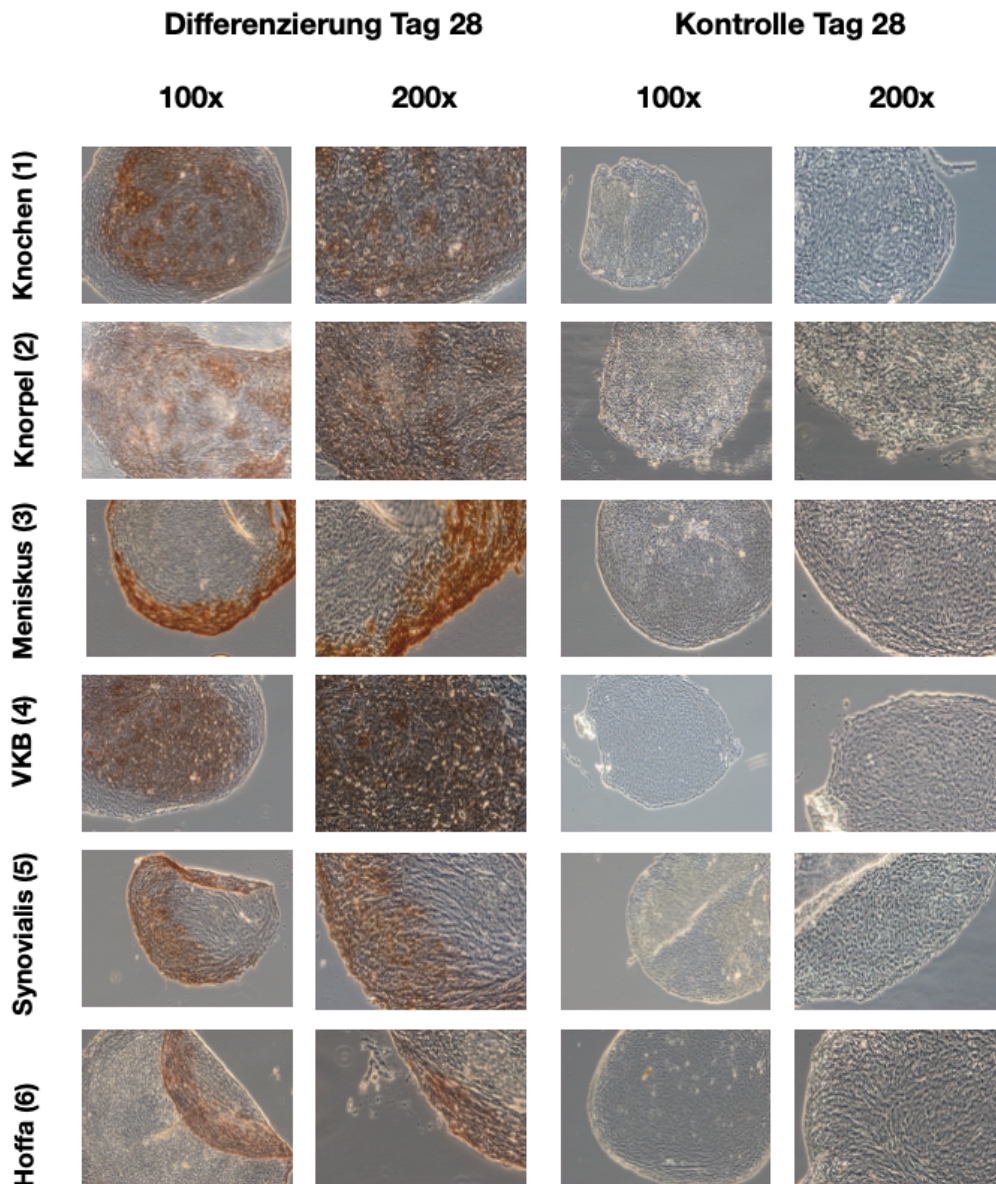


Abb. 12: 100- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Immunhistochemischen - Färbung von Kollagen Ila1 (Col II) und der dazugehörigen Negativkontrollen von Spongiosa des Femurs (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6) an Tag 28 der chondrogenen Differenzierung.

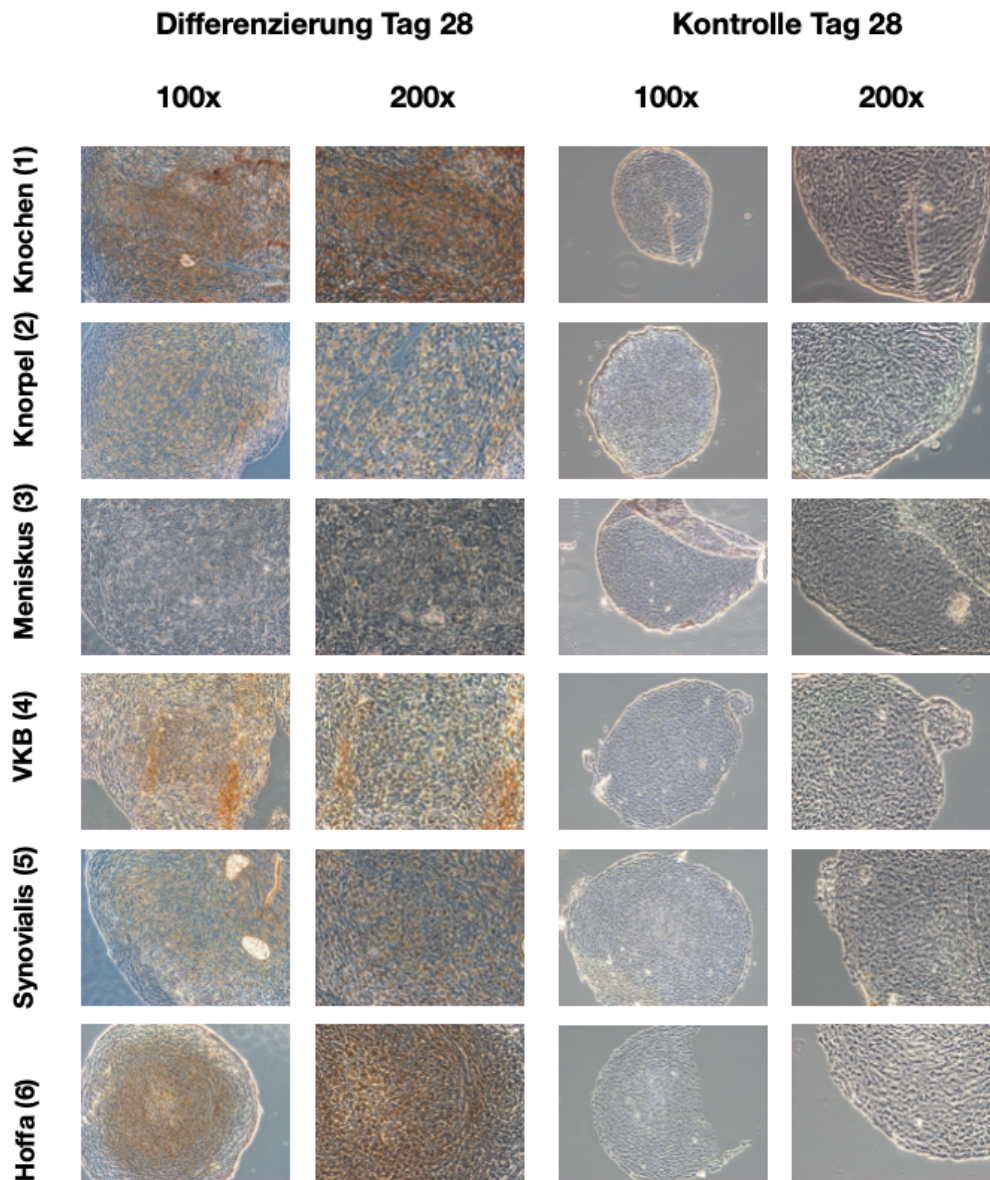


Abb. 13: 100- und 200-fach vergrößerte Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Immunhistochemischen - Färbung von Kollagen X (Col X) und der dazugehörigen Negativkontrollen von Spongiosa des Femurs (1), Kniegelenksknorpel (2), Meniskus (3), vorderem Kreuzband (4), Synovialmembran (5) und Hoffa-Fettkörper (6) an Tag 28 der chondrogenen Differenzierung.



#### 4.4.4 Semiquantitative PCR-Analyse von chondrogenen Markergenen

Um auch auf molekularbiologischer Ebene einen Nachweis über die chondrogene Differenzierung zu erhalten, wurde auch von der cDNA dieser Differenzierung eine semi quantitative PCR durchgeführt. Dies erfolgte anhand der Markergene Aggrecan core protein (AGN), SRY-Box-9 (SOX9) und Col II. Des Weiteren wurde auch auf molekularbiologischer Ebene nach dem Hypertrophiemarker Col X und zusätzlich nach OC, einem weiteren Hypertrophiemarker der chondrogenen Differenzierung, getestet. Nach der PCR wurden die Produkte mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht und anschließend densitometrisch ausgewertet. Anhand dieser Werte konnte dann ein Nachweis und Vergleich der Expression der Markergene innerhalb der einzelnen Gewebe erfolgen.

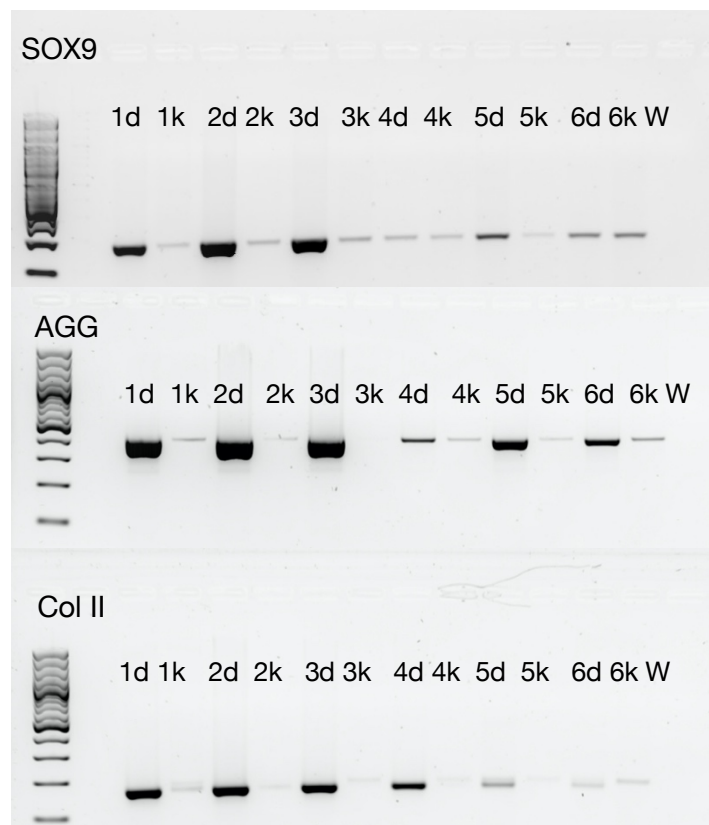
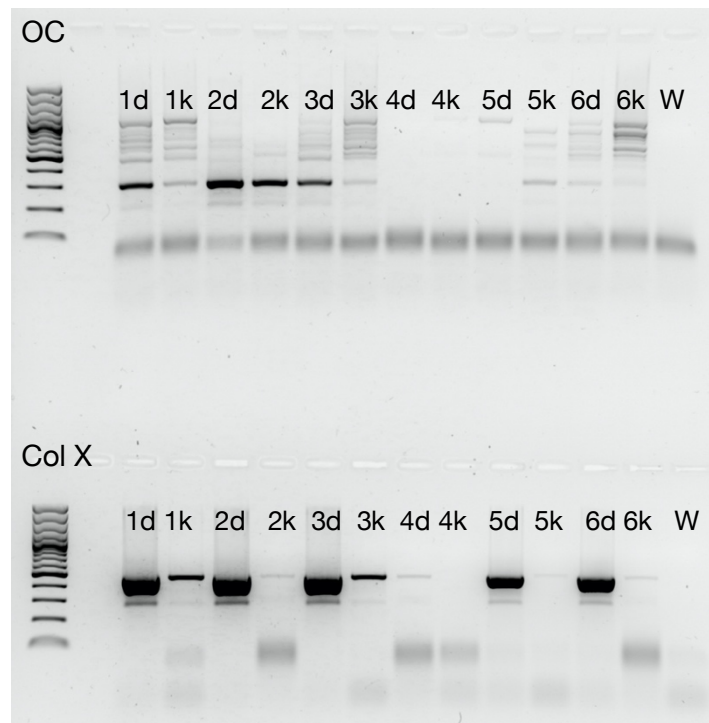


Abb. 14: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR Produkte der chondrogenen Markergene SOX9, AGG und Col IIa1. Zu erkennen sind die Banden der Differenzierungen (1d-6d), sowie der zugehörigen Kontrollen (1k-6k). Des Weiteren ist eine Wasserprobe (W) abgebildet.



**Abb. 15: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR Produkte der chondrogenen Hypertrophiemarker OC und Col X. Abgebildet sind die Banden der Differenzierungen (1d-6d), sowie der zugehörigen Kontrollen (1k-6k). Des Weiteren ist eine Wasserprobe (W) abgebildet.**

Um die einzelnen Gewebe auch unterhalb der Spenderinnen vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse alle Spenderinnen statistisch zusammengefasst und nach ihrem Mittelwert aufgetragen. Zusätzlich wurde auch die Standardabweichung miterfasst.

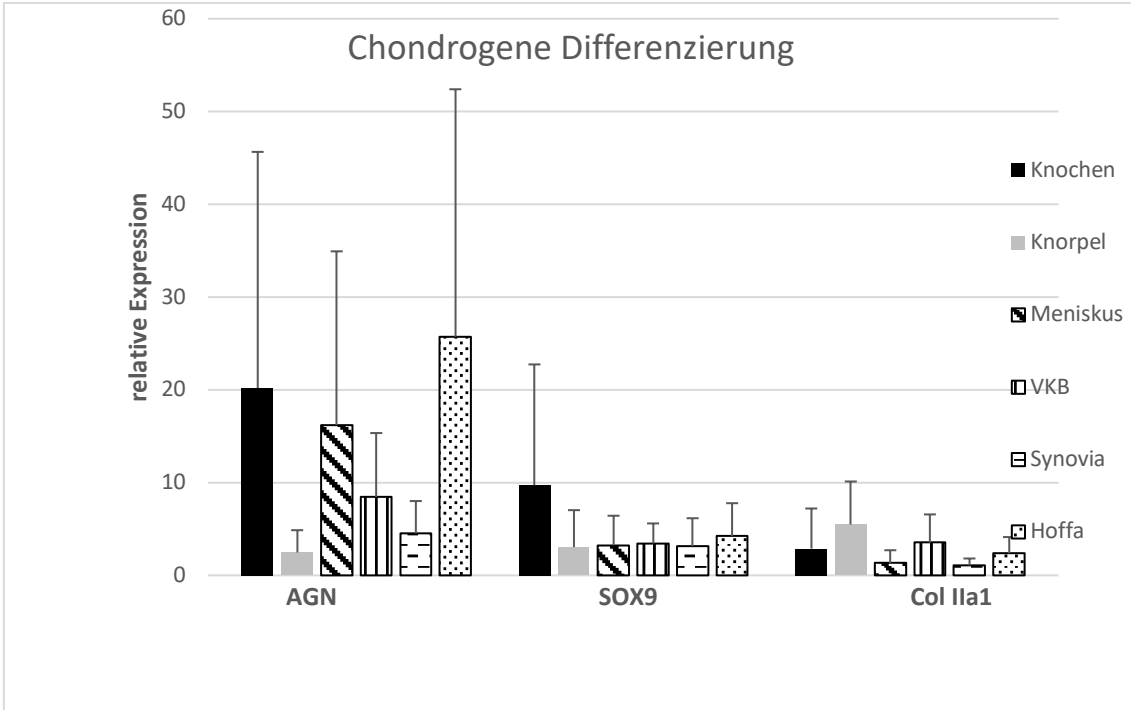


Abb. 16: Densitometrische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression der Markergene AGN, Sox9 und Col IIa1 der chondrogenen Differenzierung, welche mit Hilfe der semiquantitativen PCR innerhalb der sechs Gewebe des Kniegelenkes ermittelt wurden.

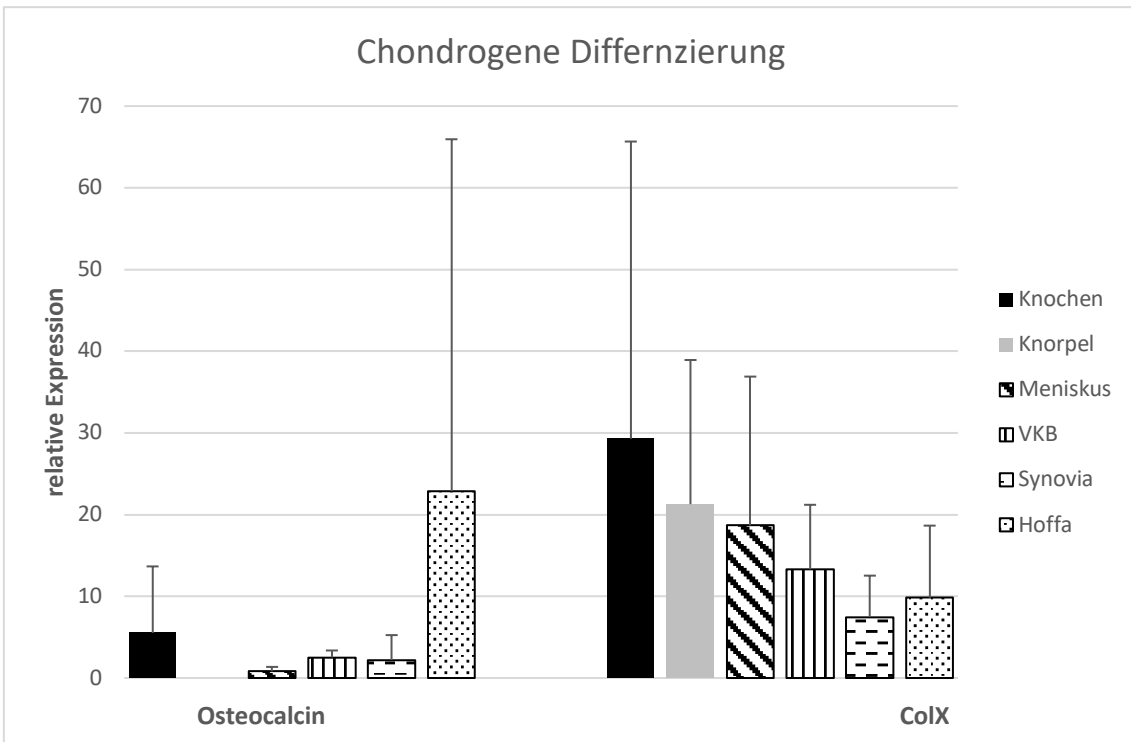


Abb. 17: Densitometrische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression der Hypertrophiemarkergene OC und Col X der chondrogenen Differenzierung, welche mit Hilfe der semiquantitativen PCR innerhalb der sechs Gewebe des Kniegelenkes ermittelt wurden.

Wie anhand der Balkendiagramme ersichtlich ist, zeigen alle differenzierten Gewebe eine Expression der Markergene des chondrogenen Wachstums. Dabei ist zu erkennen, dass die Zellen des Knorpelgewebes eine recht einheitliche Expression von AGN, Sox9 und Col II zeigen, während die anderen Gewebe teils sehr starke und teils schwache Expressionen mit einer hohen Standardabweichung zeigen. Bei den Hypertrophiemarkern OC und Col X ist auffällig, dass die differenzierten hMSCs des Knorpels im Gegensatz zu den anderen Geweben keine Expression von OC zeigen, sondern nur Col X als Hypertrophiemarker exprimiert wird.

Bei der Betrachtung fällt des Weiteren auf, dass insbesondere die Zellen des Hoffa-Fettkörpers ein sehr inhomogenes Bild zeigen. Während die Expression von AGN und OC hoch ist, allerdings auch eine große Standardabweichung aufweist, ist die Expression insbesondere von Col II sehr niedrig. Noch geringer ist die Expression von Col II allerdings bei den Zellen des Meniskus und der Synovialmembran ausgeprägt.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion von Material und Methoden**

#### **5.1.1 Verwendung von primären humanen Zellen versus Zellkulturlinien**

In der in vitro-Analyse des Differenzierungspotentials von Zellen bietet die Verwendung von primären Zellen, wie zum Beispiel MSCs, anstelle von Zellkulturlinien, wie beispielsweise C3H10T1/2-Zellen, den Vorteil, dass die MSCs eine größere Variabilität und Differenzierungskapazität aufweisen. Auf Grund dieser Tatsache eignen sich primäre Zellen insbesondere für die in vitro-Untersuchungen zum Differenzierungspotential von multipotenten Zellen. Auch wenn die C3H10T1/2-Zellen mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 chondrogen differenzieren können [77], muss man bedenken, dass es sich hierbei um multipotente Zellen aus Mäuseembryos handelt. Um eine ausreichende Aussagekraft für das Verhalten in den Zellen für die klinische Anwendbarkeit zu gewinnen, war es außerdem wichtig, dass es sich um Zellen humanen Ursprungs handelt. Daher wurden für diese Arbeit ausschließlich humane MSCs verwendet, welche aus sechs verschiedenen Geweben des Kniegelenkes von Patientinnen gewonnen wurden, welche auf Grund einer fortgeschrittenen Gonarthrose eine Knie-TEP benötigten.

#### **5.1.2 Pelletkulturen versus andere dreidimensionale Kulturverfahren für die chondrogene Differenzierungsreihe**

Pelletkulturen zeichnen sich insbesondere durch ihre einfache Handhabung bei der in vitro-Kultivierung einer Zellkultur zur chondrogenen Differenzierung aus. Die hohe Zelldichte und die hohe Anzahl an möglichen Zell-Zell-Interaktionen erlauben eine schnelle und einfache Entwicklung der Zellen. Ein großer Nachteil ist allerdings die sehr geringe Größe der Pellets, welche eine klinische Anwendung dieser Kulturen nahezu unmöglich macht. Auch kommt es im

Zentrum der Pelletkultur oftmals zur Ausbildung nekrotischer Areale. Trotz dieser Umstände eignet sich die Pelletkultur, auf Grund ihrer simplen Handhabung und guter Differenzierungsbedingungen zur in vitro-Beurteilung von Zellen.

Um die genannten Probleme in der klinischen Anwendung zu umgehen, wurden im Tissue Engineering dreidimensionale Texturen entwickelt, an welchen die kultivierten Zellen wachsen können und ein größeres, funktionelles Zellnetzwerk aufbauen können [78]. Diese als Trägersubstanzen fungierenden Strukturen, meist bestehend aus Hydrokollidgelen oder Polymeren [79], ermöglichen es, komplexere und großflächigere chondrogene Zellkulturen zu kultivieren, um auf die klinischen Probleme einzugehen [80, 81]. Durch Änderungen der verwendeten Materialien und die Kopplung von Zusätzen an diese, entstehen dabei auch stetig neue Ansätze. So konnten beispielsweise *Böck et al.* jüngst, durch die Modifikation von TGF- $\beta$ 1 Bindungen an ein Hyaluronsäure/Polyglycidol-Hydrogel eine Steigerung der chondrogenen Differenzierung von hMSCs bewirken [82]. Auch die Kombination mit erhöhtem Druck, um die Gegebenheiten im menschlichen Körper besser zu simulieren, zeigten erfolgsversprechende Ergebnisse [83]. Der hohe Aufwand, sowie die erheblichen Kosten, machen diese Methoden jedoch für die meisten in vitro-Studien zu wenig gebräuchlichen Kultursystemen.

Da es in dieser Arbeit vorrangig darum ging, die verschiedenen Kniegelenksgewebe in ihren Grundzügen des Differenzierungspotentials zu vergleichen, wurde für den Vergleich der chondrogenen Differenzierung die standardisierte Pelletkultur genutzt.

### **5.1.3 Verwendung von Wachstumsfaktoren versus Gentransfer**

Die Verwendung von verschiedenen Wachstumsfaktoren, welche dem Zellkulturmedium hinzugefügt werden, stellt eine gute und einfache Methode dar, um Zellen in vitro den nötigen Reiz zur Differenzierung zu geben. Durch die Verwendung von standardisiertem Zellkulturmedium, wie zum Beispiel das in dieser Arbeit verwendete DMEM/High Glucose (Life Science), mit

unterschiedlichen Zusätzen können die hMSCs, wie unter anderem in dieser Arbeit gezeigt, in die drei verschiedenen Zelllinien differenziert werden. Diese Methode eignet sich insbesondere für die in vitro-Anwendung, da hierbei die Zellen dem Medium leicht zugänglich sind, ohne dass andere Umstände einwirken können.

Die Verwendung von Gentransfers, beispielsweise unter Verwendung von Adenoviren, hat sich dagegen für die in vivo-Stimulation von MSCs bewährt. Durch den Gentransfer können Zellen die benötigten Wachstumsfaktoren selber exprimieren und dadurch vor Ort den benötigten Differenzierungsreiz auf physiologische Weise über einen längeren Zeitraum abgeben [84, 85].

Da es sich bei dieser Arbeit um eine in vitro-Studie handelt, wurde auf die Differenzierung durch Wachstumsfaktoren mittels Kulturmedien zurückgegriffen, um einen gleichmäßigen Stimulationsreiz für die Zellen zu setzen.

#### **5.1.4 Diskussion der Analysetechniken**

Um nach der erfolgreichen Isolation von Zellen aus Nativgeweben bestimmen zu können um was für eine Zellart es sich handelt, gibt es eine Vielzahl an Methoden um die Zelle weitergehend zu charakterisieren. Gängige Methoden sind dabei histochemische Färbetechniken, immunhistochemische Färbungen, biochemische Messungen der Genexpression mittels PCR, die Messung der Zellvitalität oder der Zellproliferation. In dieser Arbeit wurde sich auf histochemische sowie immunhistochemische Färbungen, Genexpression und die Bestimmung von Oberflächenmarkern zur Zellcharakterisierung fokussiert, während die Zellvitalität und Zellproliferation zunächst nicht näher mitbestimmt wurde.

Bei den histochemischen Färbungen der Zellen wurde sich für die Färbung mit Oil Red für den Nachweis adipogener Zellen, Alizarin Rot für den Nachweis osteogener Zellen sowie Alcianblau für den Nachweis von chondrogenen Zellen entschieden. Weitere Möglichkeiten bietet beispielsweise die Färbung mit Sudan III als Alternative zur Oil Red Färbung zur Darstellung von Fettvakuolen, welche jedoch nicht so kräftig ausfällt wie die Färbung mit Oil Red und daher nicht so

deutlich sichtbar ist.

Die Alkalische Phosphatase-Färbung zum Nachweis von Osteoblasten oder die Silbermethode nach „Kossa“ zur Darstellung Kalzium, stellen Alternativen zur Färbung mit Alizarin Rot dar. Hierbei ist zu beachten, dass Alizarin Rot im Gegensatz zur „von Kossa“ Färbung ein Chelat mit den Calciumionen bildet, wodurch diese gefärbt werden, während bei der „von Kossa“-Färbung Calciumsalze über die Bindung und Färbung des Phosphates dargestellt werden.

Safranin O stellt eine Alternative Färbung zur Darstellung von Proteoglykanen bei Knorpelgeweben dar. Es ist eine beliebte Färbung, wenn es sich darum handelt den Anteil an Proteoglykanen bei normalem Knorpelgeweben darzustellen. Jedoch gilt es als nachteilig, wenn der Anteil von GAGs erniedrigt ist [131]. Im Gegensatz dazu färbt Alcianblau auch bei einem erniedrigten Anteil von GAGs. Da bei den differenzierten Zellen der Anteil von GAGs undefiniert war, wurde zunächst zum generellen Nachweis die Färbung mit Alcianblau bevorzugt.

Eine weitere gängige Analysetechnik ist die Messung der Genexpression mittels RT-PCR. Hierbei gibt es die Möglichkeit der semiquantitativen RT-PCR, welche auch für diese Arbeit benutzt wurde, sowie die Real-Time RT-PCR. Im Gegensatz zur semiquantitativen RT-PCR, bei welcher die Genexpression nach der durchgeführten Vermehrung des Ausgangsproduktes gemessen wird, passiert dieses bei der Real-Time RT-PCR bereits während der exponentiellen Vermehrungsphase. Dadurch ist es möglich, bei dieser Methode ein genaueres Messergebnis zu erzielen, da einerseits keine weiteren Schritte vor der Messung benötigt werden, wodurch Verunreinigungen reduziert werden können, sowie andererseits eine Größere Anzahl an Genprodukten zur Quantifizierung herangezogen werden. Insbesondere auf Grund der technischen Gegebenheiten in unserem Labor wurde für diese Arbeit die semiquantitative RT-PCR verwendet.

Als Haushaltsgen wurde in dieser Arbeit EF1 $\alpha$  bei der PCR verwendet, da dieses im Labor etabliert war. Eine andere Möglichkeit stellt beispielsweise Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) dar. Beide Gene eignen



sich gut zur Verwendung als Haushaltsgen, da sie in den meisten Zellen vorkommen und von diesen konsekutiv exprimiert werden.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Diskussion von Zellcharakteristika**

Bei den einzelnen Differenzierungen der Zellen waren in der Auswertung der verschiedenen Methoden Unterschiede zwischen den Zellcharakterika zu beobachten. So zeigt sich bei der mikroskopischen Betrachtung der isolierten nativen Zellen, dass sich spindelförmige Zellen bilden, welche sich dann im Verlauf durch Proliferation und zunehmende Zell-Zell-Kontakte zu Zellkolonien zusammenschließen. Dieses Verhalten wurde bereits 1976 von *Friedentstein* als ein Charakteristikum von MSCs beschrieben [132].

Beobachtet man anschließend mikroskopisch die Entwicklung der Zellen unter dem Einfluss der Differenzierungsmedien so zeigt sich eine Veränderung der Zellstruktur. So lagern sich beispielsweise die Zellen bei der adipogenen Differenzierung weniger dicht zusammen und bilden Vesikel aus, welche sich zwischen den Zellen verteilen. Dies ist insbesondere bei den Zellen welche ursprünglich aus fetthaltigen Geweben, wie beispielsweise dem Hoffa-Fettkörper, isoliert wurden zu beobachten.

Im Gegensatz dazu kann man bei der osteogenen Differenzierung erkennen, dass die Zellen einen eher spindelförmigen Charakter annehmen und zunehmend netzartige Zell-Zell-Kontakte ausbilden, wie es für Knochen charakteristisch ist. Auch hier ist diese Morphologie am deutlichsten bei den Zellen zu beobachten, welche ursprünglich aus der Spongiosa gewonnen wurden. Dies unterstützt die von *Armiento et al.* aufgestellte These, dass MSCs ein gewissen Erinnerungspotential an ihr ursprüngliches Herkunftsgewebe aufweisen [4].

Für die FACS Analyse wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Markerprofil von CD90, CD105, CD73 und CD44 gewählt, da diese Marker laut verschiedener Studien wie beispielsweise von *Dominici et al.* sowie *Ramos et al.* und der

Definition des ISCT folgend ein Teil der Charakterisierung von MSCs darstellen [57, 58]. Andere Marker stellen beispielsweise noch die hämatopoetischen Markergene CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 oder HLA-Klasse-II-Antigene, welche nur zu weniger als 2% exprimiert werden dürfen, um der Definition von MSCs zu entsprechen [58]. Da die Zellen in dieser Arbeit die Marker CD44, CD 90 und CD105 mit über 95% exprimieren, liefert dies einen weiteren Anhaltspunkt, dass es sich bei den Zellen um MSCs handelt.

### **5.2.2 Adipogene Differenzierung der sechs verschiedenen Gewebe**

Bei der adipogenen Differenzierung der Zellen kann beobachtet werden, dass sich bereits in einer frühen Phase der Entwicklung die Ausbildung von lipidhaltigen Vesikeln innerhalb der Gewebe zeigt. Durch die Oil-Red Färbung konnte belegt werden, dass es sich dabei auch tatsächlich um eine für adipogene Gewebe typische EZM handelt. Auch in der semiquantitativen RT-PCR konnte bei allen Geweben die Expression der adipogenen Marker LPL und PPAR $\gamma$  nachgewiesen werden.

Vergleichend zeigen sich jedoch sowohl histologisch als auch in der relativen Expression der Markergene gewisse Unterschiede. So ist zu erkennen, dass sich im Rahmen der adipogenen Differenzierung der Gewebe bei den hMSCs des Knochens, des VKB und des Hoffa-Fettkörpers schon zwischen dem siebten und 14. Tag eine deutlich erkennbare Anzahl an Vesikeln ausbildet. Gegen Ende des Differenzierungszeitraums war zwar bei allen Geweben eine Ausbildung von lipidhaltigen Vesikeln zu erkennen, jedoch zeigte sich die Verteilung dieser in der lichtmikroskopischen Betrachtung bei den aus dem Hoffa-Fettkörper stammenden hMSCs am homogensten. Auch in der Färbung mit Oil-Red zeigte sich bei der Betrachtung der gefärbten Vesikel bei den Zellen des Hoffa-Fettkörpers das gleichmäßigste Bild. Bereits in einer früheren Studie von *Yoshimura et al.* hatte sich gezeigt, dass MSCs aus Fettgewebe und Synovialmembran eine stärkere Vesikelexpression und Anfärbung mit Oil Red im Vergleich zu MSCs aus knöchernen Geweben zeigen [104].

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zeigt sich die höchste Expression von PPAR $\gamma$  bei den hMSCs der Synovialmembran. Auch die Expression von LPL ist bei diesen Zellen mit am stärksten ausgeprägt. Während die Zellen des Hoffa-Fettkörpers zwar eine ebenso starke Expression von LPL zeigen, ist diese bei PPAR $\gamma$  schwächer ausgeprägt. Jedoch zeigten sich die gewonnenen Ergebnisse statistisch nicht signifikant.

### **5.2.3 Osteogene Differenzierung der sechs verschiedenen Gewebe**

In der Zusammenschau der Ergebnisse der osteogenen Differenzierung kann festgestellt werden, dass es bei allen Geweben in der histologischen Betrachtung zur Ausbildung von osteogenen Strukturen kam. So ist schon während des Differenzierungszeitraums zu beobachten, dass die hMSCs, welche dem Differenzierungsreiz ausgesetzt wurden, bereits nach circa 14 Tagen eine deutliche Ausbildung einer Vielzahl an Zell-Zell-Kontakten ausbilden. Diese zeigen sich an Tag 21 der Differenzierung bei allen Geweben noch ausgeprägter. Des Weiteren ist zu erkennen, dass sich die Zellen in ihrer Morphologie und Anordnung zwischen den einzelnen Geweben leicht unterscheiden. So sind die hMSCs der Spongiosa spindelförmig in ihrem Aussehen und in einer, an spongiösen Knochen erinnernden Konfiguration angeordnet, während beispielsweise die Zellen des Knorpels eine rundlichere Form aufweisen und ein weniger dichtes Netz aufbauen. Die hMSCs des Meniskus und des VKBs zeigen, ähnlich wie die aus der Spongiosa isolierten Zellen, einen spindelförmigen Zellcharakter und ein dichtes Netz aus Zell-Zell-Kontakten. Hingegen zeigt sich bei den Zellen der Synovialmembran und des Hoffa-Fettkörpers ein lichtereres Netz. In der Alizarin Rot S Färbung, welche die calciumhaltige EZM darstellt, ist auch wieder bei allen Geweben eine deutliche Rotfärbung zu erkennen. Allerdings lässt sich bei genauerer Betrachtung auch in dieser Färbung ein Unterschied in der Zell-Matrix Relation erkennen. So ist bei den differenzierten hMSCs aus der Spongiosa und der Synovialmembran eine gleichmäßige Verteilung der gefärbten EZM zu erkennen. Dahingegen zeigen die

anderen vier Gewebe eine ungleichmäßigere Verteilung. So ist insbesondere bei den Zellen des Knorpels und des Hoffa-Fettkörpers eine punktförmigere Verteilung zu erkennen.

In der Auswertung der semiquantitativen RT-PCR zeigt sich bei allen Geweben eine Expression der osteogenen Markergene. Die Zellen des Knochen- und Knorpelgewebes zeigen bei allen vier Genen eine Expression mit einer geringen Standardabweichung, wobei die größte Abweichung, wie bei allen Geweben, in der Expression von Col X zu beobachten ist. Auch die hMSCs, welche aus dem Meniskus und der Synovialmembran isoliert wurden, zeigen eine homogene Expression der Marker. Allerdings ist zu beobachten, dass gerade die Zellen der Synovialmembran eine geringe Expression von OC zeigen. Des Weiteren zeigen beide Gewebe eine höhere Expression von Col X als die Zellen des Knochens und Knorpels. Die hMSCs des vorderen Kreuzbandes präsentieren sich bei der Expression von OC und Col I vergleichbar mit den Zellen des Meniskus, allerdings zeigt sich eine höhere Expression von ALP sowie eine geringere Expression von Col X. Die Zellen des Hoffa-Fettkörpers zeigen die stärkste Expression von ALP, Col I und Col X sowie eine geringe Expression von OC. Allerdings ist zu erkennen, dass die Standardabweichung bei ALP, Col I und Col X sehr ausgeprägt ist. So sind diese Werte als sehr durchmischt in der Differenzierung der einzelnen Proben des Fettkörpers zu sehen und die Ergebnisse kritisch zu betrachten, da sich keine statistische Signifikanz zeigt.

#### **5.2.4 Chondrogene Differenzierung der sechs verschiedenen Gewebe**

Auf Grund der Differenzierung in Pelletkulturen wurde das Wachstum der Gewebe während der Differenzierung, anders als bei den Monolayerkulturen, nicht miteinander verglichen. Der histologische Vergleich erfolgte erst anhand der Ergebnisse der Alcian Blau Färbung, sowie anhand der immunhistochemischen Färbungen von Col II und X. Des Weiteren wurde, wie bei den anderen Differenzierungen auch, die Expression einer Reihe von Markergenen mittels semiquantitativer RT-PCR innerhalb der einzelnen Gewebe

verglichen.

Bei der Alcian Blau Färbung konnte beobachtet werden, dass alle Gewebe eine Proteoglykan-haltige EZM produziert haben. Allerdings sieht man klare Unterschiede in der Zell-Matrix Struktur. Während beispielsweise bei den differenzierten hMSCs des Knorpelgewebes eine sehr gleichmäßige Verteilung der Zellkerne und der Matrix zu beobachten ist, zeigt sich bei den Zellen des Knochengewebes und der Synovialmembran, zwar ebenfalls eine gute Verteilungsrelation, jedoch ist diese bei den Zellen des Knochens ein wenig spärlicher als bei den Knorpelzellen und bei der Synovialmembran zeigt sich an einer Stelle eine deutliche Ballung von Zellkernen. Diese Ballung an Zellkernen zeigt sich auch bei den anderen drei Gewebearten. Dies kann jedoch auch durch die Nutzung eines Pelletkultursystems bedingt sein, da es bei diesen Systemen kulturbedingt gelegentlich zur Ausbildung nekrotischer Areale im Kern der Kultur kommt.

Bei Betrachtung der immunhistochemischen Färbung für Col II ist eine deutliche und homogene Färbung der differenzierten hMSCs der Spongiosa und des Knorpels zu erkennen, während bei den Zellen des Meniskus und des Hoffa-Fettkörpers, eine eher punktförmige Färbung ersichtlich ist. Die Färbungen des VKB, sowie der Synovialmembran fallen für Col II eher schwach aus und es sind nur vereinzelt positiv gefärbte Areale zu erkennen. Bei der Färbung von Col X hingegen zeigen alle Gewebe, bis auf die Zellen des Meniskus, bei dem diese Färbung eher schwach ausfällt, eine deutliche positive Färbung, welche auch größere gefärbte Areale zeigt, als die Col II Färbung. Betrachtet man diese Ergebnisse mit der Expression der Gene in der RT-PCR so ist zu erkennen, dass diese größtenteils übereinstimmen. So ist bei den Zellen der Synovialmembran zwar eine Expression von Col II zu erkennen, allerdings ist diese recht schwach ausgeprägt, so dass dies mit der Beobachtung der immunhistochemischen Färbung übereinstimmt. Des Weiteren kann bei den Ergebnissen der PCR beobachtet werden, dass alle Gewebe die Marker der chondrogenen Differenzierung, AGN, Sox9 und Col II exprimieren. Jedoch zeigt sich die Expression der einzelnen Marker unter den Geweben recht inhomogen verteilt. So zeigen die Knorpelzellen die niedrigste Expression bei den chondrogenen

Markern AGN und Sox9, jedoch die höchste Expression von Col II. Die Zellen des Knochengewebes zeigen dahingegen, ebenso wie die Zellen des Meniskus und Hoffa-Fettkörpers, eine deutlich höhere Expression von AGN und im Falle der Spongiosazellen auch von Sox9, jedoch sind diese hohen Expressionen auch mit einer hohen Standardabweichung vergesellschaftet. Auch die Zellen des VKB und der Synovialmembran zeigen eine, gegenüber den Knorpelzellen, erhöhte Expression von AGN und Sox9, jedoch bei einer deutlich geringeren Standardabweichung als dies bei den Zellen des Knochens, des Meniskus und des Fettkörpers gezeigt wurde. Betrachtet man die Hypertrophiemarker OC und Col X fällt vor allem die nicht nachweisbare Expression von OC bei den hMSCs des Knorpelgewebes auf. Dahingegen weisen insbesondere der Hoffa-Fettkörper und das Knochengewebe eine hohe Expression von OC auf, jedoch auch wieder eine hohe Standardabweichung. Bei der Expression von Col X hingegen zeigen, bis auf die Zellen der Synovialmembran, alle Gewebe eine recht hohe Expression.

### **5.2.5 Vergleich des Differenzierungspotentials der einzelnen Gewebe**

Um als multipotente MSC bezeichnet werden zu können, sollten die Zellen, laut der Definition der ISCT, drei Kriterien erfüllen. Wie anhand dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zeigen die Zellen, welche aus den sechs verschiedenen Geweben gewonnen werden konnten, sowohl eine Plastikadhärenz an den Zellkulturflaschen als auch das Potential sowohl adipogen, osteogen, als auch chondrogen differenziert zu werden. Das dritte Kriterium ist, wie bereits in 1.1.2 beschrieben, die Expression, bzw. das Fehlen, bestimmter Oberflächenantigene.

Das Vorkommen der verschiedenen MSCs, welche für diese Arbeit verwendet wurden, konnte bereits durch mehrere Arbeiten demonstriert werden. So wurde die Präsenz und das Differenzierungspotential von MSCs aus dem Knochenmark, welche weiterhin als Goldstandard im Tissue Engineering gelten, bereits in zahlreichen Studien untersucht [29, 30, 85]. Des Weiteren konnten die

Arbeiten von, unter anderem, *Alsalameh et al.* sowie *Pretzel et al.* zeigen, dass eine Isolation von MSCs aus dem superfiziellen Stratum von sowohl arthrotischem als auch gesundem hyalinen Knorpel möglich ist [86, 87]. Auch das Vorkommen von MSCs innerhalb der Synovialmembran konnte bereits in früheren Studien bewiesen werden [33, 88]. Es wird vermutet, dass sich die MSCs innerhalb der Synovialmembran insbesondere in der Intima sowie innerhalb der kleinen Blutgefäße der Subintima befinden [89]. Da diese Blutgefäße eine Verbindung zwischen der Synovia und dem Knochenmark bilden, wird vermutet, dass MSCs des Knochenmarks bei einem Defekt in die Synovia und die umgebende Synovialmembran migrieren könnten [89]. Funktionell gesehen bildet die Synovialmembran zusammen mit dem infrapatellaren Fettkörper eine Einheit, welche auch als „adipogenes Synovium“ bezeichnet wird [90]. Auf Grund dieser Tatsache ist es auch nicht verwunderlich, dass auch innerhalb des Fettkörpers MSCs nachgewiesen werden können [34, 91]. *Steinert et al.* sowie weitere Arbeitsgruppen konnten des Weiteren ein Vorkommen von MSCs innerhalb des VKB nachweisen, bei welchem vermutet wird, dass die Zellen dort innerhalb der Sinusoide, Faszikel und dem Endothel der kleinen Blutgefäße residieren [40-42, 92]. Das Vorkommen von MSC sowie von multipotenten Fibrochondrozyten innerhalb der Mensiken wurden des Weiteren bereits durch *Mauck et al.* beschrieben [35]. Eine interessante Beobachtung bei all diesen Geweben ist ihr gemeinsamer embryonaler Ursprung aus dem lateralen Mesoderm [93, 94]. Dieser gemeinsame Ursprung unterstützt die These, dass eine Differenzierung in eins der anderen Gewebe möglich ist. Wie mit Hilfe dieser Arbeit weiterführend belegt werden konnte, haben die hierfür isolierten Zellen aus den sechs untersuchten Gewebe des Kniegelenkes eine Plastikadhärenz an den Kulturflaschen gezeigt. Des Weiteren konnte anhand der verschiedenen histologischen Färbungen für alle Zelllinien belegt werden, dass diese das Potential besitzen sowohl adipogen, osteogen, als auch chondrogen differenziert zu werden. Auch in der FACS-Analyse konnte für mind. 98% aller isolierten Zellen gezeigt werden, dass diese CD90, CD105 und CD44 positiv sind, welches laut *Ramos et al.* die Zellmarker für hMSCs sind [58]. Somit sind alle drei Kriterien für die Definition von MSCs durch die isolierten Zellen erfüllt.

Bereits in vorherigen Studien konnte belegt werden, dass aus allen sechs Geweben, sowohl beim gesunden Gelenk als auch beim arthrotischen Gelenk, MSCs isoliert werden können, welche eine Expression der CD-Marker sowie eine Plastikadhärenz aufweisen [29, 34, 41, 42, 86, 87, 95, 96].

Vergleichend lassen sich jedoch Unterschiede in der Qualität dieser differenzierten Zellen aufzeigen. So lässt sich bei allen drei Differenzierungswegen erkennen, dass zumindest histologisch die hMSCs, welche ursprünglich aus dem am ähnlichsten Gewebe isoliert wurden, die größte Ähnlichkeit zu dem Gewebe nach der Differenzierung aufweisen. Interessanterweise scheinen jedoch auch die hMSCs der Spongiosa und der Synovialmembran ein vielversprechendes Ergebnis in allen drei Differenzierungswegen zu erlangen. So sind die Zellen der Spongiosa und der Synovialmembran, in dieser Arbeit, zwar nicht immer die Zellen mit der höchsten Expression der Markergene in den semiquantitativen RT-PCRs, allerdings weisen sie stets eine Expression der Gene auf und sind dabei meist, im Gegensatz zu den anderen untersuchten Geweben, nur einer geringen Standardabweichung unterlegen.

Wie bereits in Studien gezeigt werden konnte, können jedoch auch die Art der Zellpräparation und -aufbereitung Einfluss auf die Eigenschaften von MSCs haben [97-99]. Auf Grund dieser Tatsache kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen gegebenenfalls ein leicht abgewandeltes Verhalten zeigen könnten, falls andere Aufbereitungs- und Kultivierungsmethoden verwendet werden.

### **5.3 Vergleich mit anderen Studien zur Knorpelregeneration mit MSCs**

Bislang konnte eine optimale Quelle für Zellen zur Knorpelregeneration im Tissue Engineering, trotz zahlreicher Bemühungen, noch nicht etabliert werden. Die optimale Quelle für eine in-vivo Anwendung müsste sowohl durch einfache und für den Patienten sichere Methoden isolierbar als auch expandierbar sein und das Potential besitzen knorpelspezifische Moleküle zu synthetisieren ohne Immunreaktionen hervorzurufen. Auf Grund dieser Überlegungen dienen



momentan vor allem Chondrozyten, Fibroblasten, MSCs, sowie genmodifizierte Zellen als Quellen in der Forschung [100-102].

Die Tatsache, dass die Zellen der Synovialmembran in dieser Arbeit, sowohl ein gutes histologisches als auch gute Expression von Genmarkern nach der Differenzierung, lässt die Verwendung dieser Quelle für MSCs interessant erscheinen. Auch konnten bereits, wie in 4.3 erwähnt, unter anderem *Sakaguchi et al.* eine Überlegenheit der hieraus isolierten MSCs gegenüber anderen MSC-Quellen nachweisen [34, 103-105]. Eine Begründung dieser Tatsache könnte in der, wie bereits in 4.2.1 erwähnten, Annahme liegen, dass Zellen eine Erinnerung an ihr Ursprungsgewebe aufweisen [4]. Da gezeigt werden konnte, dass die Zellen der Synovialmembran einen gemeinsamen Ursprung mit den Zellen des Gelenkknorpels besitzen [106], könnten sie für die Regeneration ebendieses geeigneter sein als andere Zellen. Vor diesem Hintergrund würde sich auch zu verstehen geben, warum MSCs, welche aus Knochengewebe isoliert wurden, vermehrt zur Hypertrophie und Ausbildung von fibrocartilaginösen Geweben neigen [4, 107, 108]. Eine weitere Investigation dieser Quelle scheint daher für die klinische Forschung und potentielle in-vivo Anwendung empfehlenswert zu sein. Des Weiteren zeichnen sich hMSCs aus der Synovialmembran durch eine vergleichsweise wenig invasive in-vivo Gewinnung aus, welche ohne größere Komplikationen für den Patienten einhergeht, da die Synovialmembran ein hohes Regenerationspotential aufweist [109, 110]. Allerdings empfehlen *Pei et al.* die Gewinnung von MSCs aus der Synovialmembran über eine von ihnen entwickelte, negative Isolation [111] durchzuführen, um die Kontamination der Zellen durch Makrophagen, welche die chondrogene Differenzierung inhibieren, zu verringern und somit bessere Ergebnisse zu erzielen [112].

Neben der Wahl der optimalen Zellquelle gibt es auch mehrere Überlegungen zu den optimalen Kulturbedingungen für Zellen, welche chondrogen differenziert werden sollen, um die Hypertrophie dieser Zellen zu verhindern und einen hyalinen Knorpelersatz zu erschaffen. So gibt es unter anderem die Überlegung, ob die Kulturbedingungen in-vitro optimiert werden könnten, um ein physiologisches Wachstum der Zellen im Gelenkspalt simulieren zu können. Wie bereits von *Edler et al.* und *Zhang et al.* in Studien gezeigt, wird Knorpel durch

mechanische Kräfte, wie Scherkräfte, Kompression, hydrostatischen Druck und der Kombination aus diesen in seiner Entwicklung beeinflusst [113, 114]. Weiterhin konnte von *Jin et al.* gezeigt werden, dass die Anwendung von dynamischen Scherkräften zu einer vermehrten Synthese von chondrogenen EZM Molekülen führt [115]. Insbesondere konnte in der Kombination mit IGF-1 ein synergistischer Effekt sowohl für dynamische Scherkräfte [116], als auch in Kombination mit hydrostatischem Druck [117] gezeigt werden.

Weitere mögliche Angriffspunkte für die Entwicklung von besseren Ergebnissen in der chondrogenen Differenzierung von hMSCs ist die Kombination der potentesten Zellen mit weiterer Gentherapie. In einer Studie wurde von *Woods et al.* die Funktion von Rac1 (Ras-verwandtes C3-Botulinumtoxin-Substrat 1) als positiver Regulator bei der Entwicklung von Chondrozyten beschrieben. Rac1 hat dabei einen positiven Effekt auf die Reifung, Kalzifikation und Hypertrophie [118], indem er zu einer erhöhten Expression von Col X, MMP (Matrix Metallo-Peptidase) 13 und ADTAMTS-5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5) führt, welche eine vermehrte Hypertrophie und Kalzifikation der Chondrozyten verursachen [119]. Andere Entwicklungen versuchen von außen einen Einfluss auf die Differenzierung von MSCs zu nehmen. So gibt es Versuche über externe nicht-invasive Methoden eine chondrogene Differenzierung von MSCs anzuregen. Dabei konnten *Parate et al.* zeigen, dass Pulsative Elektromagnetische Felder (PEMF), welche einmal täglich über einen Zeitraum von 10 min mit einer Amplitude von 2 mT auf die Zellen einwirken, zu einer verstärkten chondrogenen Differenzierung von hMSCs führen [120]. Weitere Studien auf diesem Gebiet konnten in-vitro, sowie in Tiermodellen an Ratten und Kaninchen bereits eine verbesserte Heilung chondrogener Defekte durch die Verwendung von Extrakorporalen Schockwellen aufzeigen [121, 122].

Eine weitere interessante Entwicklung auf dem Weg zu effektiven Behandlungsmöglichkeiten für Knorpeldefekte, stellt die Kombination des Tissue Engineering mit der Technik des 3D-Drucks dar. Neue Möglichkeiten sind dabei durch die Entwicklung der sogenannten „Bioink“ entstanden, welche es ermöglicht, lebende Gewebestrukturen im 3D-Druck zu erschaffen [123]. Dies

geschieht, indem entweder Zellen zusammen mit Biomaterialien verbunden werden [123], oder Aggregate aus Zellpellets und Gewebestrukturen geschaffen werden [124]. Die Kombination dieser Strukturen mit MSCs scheint vielversprechend zu sein, jedoch muss auch hier, insbesondere bei der Erstellung von Knorpelersatzgewebe, erst noch ein gut reproduzierbarer Weg gefunden werden, die Hypertrophie der differenzierten Zellen zu verhindern.

Die Kombination mit dem 3D-Druck bietet, in der Theorie, des Weiteren die Möglichkeit anhand von z.B. MRT Aufnahmen, mithilfe des Computer Assisted Design (CAD) und Computer Assisted Manufacturing (CAM) passgenaue Trägersubstanzen für MSCs zu erschaffen [123]. Diese Art der Herstellung individueller Implantate beschleunigt, im Sinne der individuellen Medizin, die Therapie, da sich dadurch z.B. die OP-Zeit verkürzen lässt [125]. Des Weiteren könnte die personalisierte Medizin, langfristig betrachtet, zu einer Verbesserung der Therapie der Osteoarthritis und Senkung der Behandlungskosten führen [126]. Bis zur klinischen Anwendung dieser Technologie müssen jedoch auch noch Verbesserungen in der Gerätetechnologie erfolgen, um die 3D-Drucker effektiv, beispielsweise im OP-Saal einsetzen zu können [125].

## 6. Zusammenfassung

Mit Hilfe dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich das Differenzierungspotential von hMSCs aus sechs verschiedenen Geweben des Kniegelenkes, namentlich Knochengewebe, Knorpel, Meniskus, vorderes Kreuzband, Synovialmembran und Hoffa-Fettkörper, voneinander unterscheidet. MSCs weisen im Allgemeinen ein hohes Potential zur Differenzierung in verschiedene Gewebelinien auf und stellen somit einen optimalen Kandidaten für die Regeneration von beispielsweise erkranktem Knorpelgewebe dar.

Nach der erfolgreichen Isolation und Kultivierung der hMSCs aus den Geweben wurden diese in Monolayerkulturen adipogen, sowie osteogen differenziert. Diese Kulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung histologisch beobachtet. Weiterhin wurden Pelletkulturen für die chondrogene Differenzierung angelegt. Nach dem festgesetzten Differenzierungszeitraum wurden alle Kulturen histologisch, biochemisch und mikrobiologisch aufbereitet, um die Gewebe analysieren zu können und eine Evaluierung des Differenzierungspotentials aufzustellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hMSCs aus allen sechs verwendeten Geweben sowohl adipogen, osteogen, als auch chondrogen differenziert werden können. So fielen die Ergebnisse der Oil-Red S Färbung, der Alizarin Rot Färbung, als auch der Alcianblau Färbung für alle Gewebe nach der entsprechenden Differenzierung positiv aus. Auch konnten eine Expression der jeweiligen Gewebespezifischen Marker mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich jedoch Unterschiede in der Expressionsstärke. So konnte gezeigt werden, dass die Zellen, welche aus einem Gewebe entstammten, dass der Differenzierung entsprach, jeweils ein gutes Ergebnis erzielen konnten. Auch die hMSCs des Knochengewebes, sowie die der Synovialmembran zeigten in allen drei Differenzierungen gute Ergebnisse.

Bei der chondrogenen Differenzierung wurden neben den Differenzierungsmarkern auch die Hypertrophiemarker OC und Col X

untersucht. Dabei fiel auf, dass die geringste Expression dieser bei den hMSCs des Knorpelgewebes und der Synovialmembran zu beobachten war. Dabei war insbesondere festzustellen, dass die Zellen des Knochengewebes keine messbare Expression von OC zeigten. Die Expression von Col X war hingegen bei den hMSCs der Synovialmembran am geringsten ausgeprägt.

Auf Grund der guten erzielten Ergebnisse empfiehlt sich nach dieser Arbeit vor allem eine weitere Erforschung der Spongiosa und insbesondere der Synovialmembran als potentielle Quelle von hMSCs, sowie die Kombination von hMSCs dieser Quellen im Zusammenspiel mit modifizierten Differenzierungsbedingungen, um gegebenenfalls optimierte Ergebnisse erzielen zu können und somit der Knorpelregeneration von Arthrosepatientinnen weiterhelfen zu können.

Denn obwohl viele Grundmechanismen bereits ausgiebig erforscht wurden und es viele Studien und Ansatzpunkte in dem Bereich des Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin gibt, bleibt die Behandlung von Arthrosepatienten weiterhin ein komplexes klinisches Problem und bedarf daher weiterer Forschung.

## 7. Bibliografie

1. Newman, A.P., Articular Cartilage Repair. *The American Journal of Sports Medicine*, 1998. **26**(2): p. 309-325.
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. 432-463.
3. Huey, D.J.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A., Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. *Science*, 2012. **338**(6109): p. 917-921.
4. Armiento, A.R.; Alini, M.; Stoddart, M.J., Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv Drug Deliv Rev*, 2018.
5. Iwamoto, M.; Ohta, Y.; Larmout, C., Towards regeneration of articular cartilage. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2013. **99**(3): p. 192-202.
6. Fuentes-Mera, L.; Camacho, A.; Moncada-Saucedo, N.K.; Peña-Martínez, V., Current Applications of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering, in *Mesenchymal Stem Cells - Isolation, Characterization and Applications*. 2017.
7. Helmick, C.G.; Felson, D.T.; Lawrence, R.C.; Gabriel, S.; Hirsch, R.; Kwoh, C.K.; Liang, M.H.; Kremers, H.M.; Mayes, M.D.; Merkel, P.A.; Pillemer, S. R.; Reveille, J.D.; Stone, J.H., Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(1): p. 15-25.
8. Litwic, A.; Edwards, M.; Dennison, E.; Cooper, C., Epidemiology and burden of osteoarthritis. *Br Med Bull*, 2013. **105**: p. 185-199.
9. Filardo, G.; Madry, H.; Jelic, M.; Roffi, A.; Cucchiarini, M.; Kon, E., Stem cells in articular cartilage regeneration. *J Orthop Surg Res*, 2016. **11**: p. 42.
10. Caplan, A.I.; Mochizuki, Y.; Wakitani, S.; Goldberg, V.M., Principles of cartilage repair and regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1997. **342**: p. 254 - 269.
11. Buckwalter, J.A.; Mankin, H.J., Articular Cartilage Repair and Transplantation. *Arthritis & Rheumatism Official Journal of the American College of Rheumatology*, 1998. **41**(8): p. 12.

- 12 Steadman, J.R.; Rodkey, W.G.; Rodrigo, J.J., Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2001. 391: p. 362 - 369.
- 13 Knutsen, G.; Engebretsen, L.; Ludvigsen, T.C.; Drogset, J.O., Grøntvedt, T.; Solheim, E.; Strand, T.; Roberts, S.; Isaksen, V.; Johansen, O., Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 2004. 86(3): p. 455 - 464.
- 14 Kreuz, P.C.; Steinwachs, M. R.; Erggelet, C.; Krause, S. J.; Konrad, G.; Uhl, M.; Sudkamp, N., Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. **14**(11): p. 1119-1125.
- 15 Peterson, L.; Minas, T.; Brittberg, M.; Nilsson, A.; Sjögren-Jansson, E.; Lindahl, A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2000. 374: p. 212 - 234.
- 16 Benya, P.D.; Shaffer, J.D., Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 1982. 30(1): p. 215 - 224.
- 17 Wood, J.J.; Malek, M.A.; Frassica, F.J.; Polder, J.A.; Mohan, A.K.; Bloom, E.T.; Braun, M.M.; Coté, T.R., Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 2006. 88(3): p. 503 - 507.
- 18 Goldberg, A.; Mitchell, K.; Soans, J.; Kim, L.; Zaidi, R., The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. *J Orthop Surg Res*, 2017. **12**(1): p. 39.
- 19 Saris, D.B.; Vanlauwe, J.; Victor, J.; Haspl, M.; Bohnsack, M.; Fortems, Y.; Vandekerckhove, B.; Almqvist, K. F.; Claes, T.; Handelberg, F.; Lagae, K.; van der Bauwhede, J.; Vandenuecker, H.; Yang, K. G.; Jelic, M.; Verdonk, R.; Veulemans, N.; Bellemans, J.; Luyten, F. P., Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med*, 2008. **36**(2): p. 235-246.
- 20 Mazor, M.; Lespessailles, E.; Coursier, R.; Daniellou, R.; Best, T. M.; Toumi, H., Mesenchymal stem-cell potential in cartilage repair: an update. *J Cell Mol Med*, 2014. **18**(12): p. 2340-2350.
- 21 Chen, P.M.; Yen, M. L.; Liu, K. J.; Sytwu, H. K.; Yen, B. L., Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 2011. **18**: p. 49.

- 22 De Miguel, M.P.; Fuentes-Julian, S.; Blazquez-Martinez, A.; Pascual, C. Y.; Aller, M. A.; Arias, J.; Arnalich-Montiel, F., Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells: Advances and Applications. *Current Molecular Medicine*, 2012. **12**(5): p. 574 - 591.
- 23 Di Nicola, M.; Carlo-Stella, C.; Magni, M.; Milanese, M.; Longoni, P. D.; Matteucci, P.; Grisanti, S.; Gianni, A. M., Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3838 - 3843.
- 24 Nasef, A.; Chapel, A.; Mazurier, C.; Bouchet, S.; Lopez, M.; Mathieu, N.; Sensebé, L.; Zhang, Y.; Gorin, N. C.; Thierry, D.; Fouillard, L., Identification of IL-10 and TGF- $\beta$  Transcripts Involved in the Inhibition of T-Lymphocyte Proliferation During Cell Contact With Human Mesenchymal Stem Cells. *Gene Expression*, 2007. **13**(4-5): p. 217 - 226.
- 25 Friedenstein, A.J.; Chailakhjan, R.K.; Lalykina, K.S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 1970. **3**(4): p. 393 - 403.
- 26 Friedenstein, A.J.; Ruben, K.; Chailakhjan, R.K.; Latsinik, N. V.; Panasyuk, A. F.; Keiliss-Borok, I.V., Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Transplantation*, 1974. **17**(4): p. 331 - 340.
- 27 Owen, M., Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science Suppl.*, 1988. **10**: p. 63 - 76.
- 28 Krebsbach, P.H.; Kuznetsov, S.A.; Bianco, P.; Robey, P.G., Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1999. **10**(2): p. 165 - 181.
- 29 Pittenger, M.F.; Mackay, A.M., Beck, S.C.; Jaiswal R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A., Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R., Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143 - 147.
- 30 Nöth, U.; Osyczka, A.M.; Tuli, R.; Hickok, N.J.; Danielson, K.G., Tuan, R.S., Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002. **20**: p. 1060 - 1069.
- 31 Dowthwaite, G.P.; Bishop, J. C.; Redman, S. N.; Khan, I. M.; Rooney, P.; Evans, D. J.; Haughton, L.; Bayram, Z.; Boyer, S.; Thomson, B.; Wolfe, M. S.; Archer, C. W., The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 6): p. 889-897.



- 32 Hiraoka, K.; Grogan, S.; Olee, T.; Lotz, M., Mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage. *Biorheology*, 2006. **43**(3,4): p. 447 - 454.
- 33 De Bari, C.; Dell'Accio F.; Tylzanowski, P.; Luyten, F. P., Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. *Arthritis & Rheumatism Official Journal of the American College of Rheumatology*, 2001. **44**(8): p. 1928 - 1942.
- 34 Sakaguchi, Y.; Sekiya, I.; Yagishita, K.; Muneta, T., Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(8): p. 2521-2529.
- 35 Mauck, R.L.; Martinez-Diaz, G.J.; Yuan, X.; Tuan, R.S., Regional Multilineage Differentiation Potential of Meniscal Fibrochondrocytes: Implications for Meniscus Repair. *THE ANATOMICAL RECORD*, 2007. **290**: p. 48 - 58.
- 36 Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H., Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *TISSUE ENGINEERING*, 2001. **7**(2): p. 211 - 228.
- 37 Wickham, M.Q.; Erickson, G.R.; Gimble, J.M.; Vail, T.P.; Guilak, F., Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 2003(412): p. 196-212.
- 38 Lopez-Ruiz, E.; Peran, M.; Cobo-Molinos, J.; Jimenez, G.; Picon, M.; Bustamante, M.; Arrebola, F.; Hernandez-Lamas, M.C.; Delgado-Martinez, A.D.; Montanez, E.; Marchal, J.A., Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. **21**(1): p. 246-258.
- 39 Liu, Y.; Buckley, C.T.; Almeida, H.V.; Mulhall, K.J.; Kelly, D.J., Infrapatellar fat pad-derived stem cells maintain their chondrogenic capacity in disease and can be used to engineer cartilaginous grafts of clinically relevant dimensions. *Tissue Eng Part A*, 2014. **20**(21-22): p. 3050-3062.
- 40 Steinert, A.F.; Heymer, A.; Barthel, T., Noth, U.; Evans, C.H.; Murray, M.M., Isolation and characterization of multilineage progenitor cells from the anterior cruciate ligament. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine*, 2007. **2**(1): p. 186 - 187.
- 41 Cheng, M.T.; Yang, H.W.; Chen, T.H.; Lee, O.K., Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments. *Cell Prolif*, 2009. **42**(4): p. 448-460.

- 42 Steinert, A.F.; Kunz, M.; Prager, P.; Barthel, T.; Jakob, F.; Nöth, U.; Murray, M.M.; Evans, C.H.; Porter, R.M., Mesenchymal stem cell characteristics of human anterior cruciate ligament outgrowth cells. *Tissue Eng Part A*, 2011. **17**(9-10): p. 1375-1388.
- 43 Caplan, A.I.; Bruder S.P., Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine*, 2001. **7**(6): p. 259 - 264.
- 44 Castro-Malaspina, H.; Gay, R.E.; Resnick, G.; Kapoor, N.; Meyers, P.; Chiarieri, D.; McKenzie, S.; Broxmeyer, H.E.; Moore, M.A., Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 1980. **56**: p. 289 - 301.
- 45 Mets, T.; Verdonk, G., In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1981. **16**: p. 81 - 89.
- 46 Caplan, A.I., Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 1991. **9**: p. 641 - 650.
- 47 Clark, B.R.; Keating, A., Biology of Bone Marrow Stroma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995. **770**(1): p. 70 - 78.
- 48 Pereira, R.F.; Halford, K.W.; O'Hara, M.D.; Leeper, D.B.; Sokolov, B.P.; Polard, M.D.; Bagasra, O.; Prockop, D.J., Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**: p. 4857 - 4861.
- 49 Wakitani, S.; Saito, T.; Caplan, A.I., Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-Azacytidine. *Muscle and Nerve*, 1995. **18**: p. 1417 - 1426.
- 50 Bruder, S.P; Jaiswal, N.; Haynesworth, S.E., Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1997. **64**(2): p. 278 - 294.
- 51 Kuznetsov, S.A.; Krebsbach, P.H.; Satomura, K.; Kerr, J.; Riminucci, M.; Benayahu, D.; Robey, P.G., Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1997. **12**(9): p. 1335 - 1347.
- 52 Prockop, D.J., Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 71 - 74.

- 53 Kopen, G.C.; Prockop, D.J.; Phinney, D.G., Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Cell Biology*, 1999. **96**: p. 10711 – 10716.
- 54 Chopp, M.; Zhang, X.; Li, Y.; Wang, L.; Chen, J.; Lu, D.; Rosenblum, M., Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuro Report*, 2000. **11**(13): p. 3001 - 3005.
- 55 Woodbury, D.; Schwarz, E.J.; Prockop, D.J.; Black, I.B., Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 2000. **61**: p. 364 – 370.
- 56 da Silva Meirelles, L.; Chagastelles, P.C.; Nardi, N.B., Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-2213.
- 57 Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-317.
- 58 Ramos, T.L.; Sánchez-Abarca, L.I.; Muntión, S.; Preciado, S.; Puig, N.; López-Ruano, G.; Hernández-Hernández, Á.; Redondo, A.; Ortega, R.; Rodríguez, C.; Sánchez-Guijo, F.; del Cañizo, C., MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal*, 2016. **14**: p. 2.
- 59 Scavo, L.M.; Karas, M.; Murray, M.; Leroith, D., Insulin-like growth factor-I stimulates both cell growth and lipogenesis during differentiation of human mesenchymal stem cells into adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(7): p. 3543-3553.
- 60 Yeh, W.-C.; Cao, Z.; Classon, M.; McKnight, S.L., Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes and Development*, 1995. **9**: p. 168 - 181.
- 61 Lehmann J.M.; Lenhard, J.M.; Oliver, B.B.; Ringold, G.M.; Kliewer, S.A., Peroxisome Proliferator-activated Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(6): p. 3406 - 3410.
- 62 Hamidouche, Z.; Fromigue, O.; Ringe, J.; Haupl, T.; Vaudin, P.; Pages, J.C.; Srouji, S.; Livne, E.; Marie, P.J., Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(44): p. 18587-18591.

- 63 Hong, D.; Chen, H.-X.; Xue, Y.; Li, D.-M.; Wan, X.-C.; Ge, R., Li, J.-C., Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2009. **116**(1-2): p. 86 - 92.
- 64 Vater, C.; Kasten, P.; Stiehler, M., Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*, 2011. **7**(2): p. 463-477.
- 65 Chung, C.H.; Golub, E.E.; Forbes, E.; Tokuoka, T.; Shapiro, I.M., Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcified Tissue International*, 1992. **51**(4): p. 305 - 311.
- 66 Kielty, C.; Hopkinson, I.; Grant, M., Collagen: the collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*, Second Edition. 1993. 103 – 147.
- 67 Prockop, D.J.; Kivirikko, K.I., COLLAGENS: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. *Annual Review Biochemistry*, 1995. **64**: p. 403 - 434.
- 68 Johnstone, B.; Hering, T.M.; Caplan, A.I.; Goldberg, V.M., Yoo, J.U., In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Experimental Cell Research*, 1998. **238**: p. 265 - 272.
- 69 Jingushi, S.; Heydemann, A.; Kana, S.K.; Macey, L.R.; Bolander, M.E., Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) Injection Stimulates Cartilage Enlargement and Inhibits Cartilage Gene Expression in Rat Fracture Healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 1990. **8**: p. 364 - 371.
- 70 Yoo, J.U., Barthel, T.S.; Nishimura, K.; Solchaga, L.; Caplan, A.I.; Goldberg, V.M.; Johnstone, B., The Chondrogenic Potential of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 1998. **80-A**(12): p. 1745 - 1757.
- 71 Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Quarto, R., Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001. **9**: p. 36-40.
- 72 Na, K.; Park, J.H.; Kim, S.W.; Sun, B.K.; Woo, D.G.; Chung, H.M.; Park, K.H., Delivery of dexamethasone, ascorbate, and growth factor (TGF beta-3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes. *Biomaterials*, 2006. **27**(35): p. 5951-5957.
- 73 An, C.; Cheng, Y.; Yuan, Q.; Li, J., IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann Biomed Eng*, 2010. **38**(4): p. 1647-1654.

- 74 Fortier, L.A.; Barker, J.U.; Strauss, E.J.; McCarrel, T.M.; Cole, B.J., The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*, 2011. **469**(10): p. 2706-2715.
- 75 Chimal-Monroy, J.; Díaz de León, L., Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 and  $\beta$ 5 during the formation of precartilaginous condensations. *The International Journal of Developmental Biology*, 1999. **43**: p. 059 - 067.
- 76 Burdan, F.; Szumilo, J.; Korobowicz, A.; Farooquee, R.; Patel, S.; Patel, A.; Dave, A.; Szumilo, M.; Solecki, M.; Klepacz, R.; Dudka, J., Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009. **47**(1): p. 5-16.
- 77 Denker, A.E.; Haas, A.R.; Nicoll, S.B.; Tuan, R.S., Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation*, 1999. **64**(2): p. 67-76.
- 78 Langer, R.; Vacanti, J.P., Tissue engineering. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920 - 926.
- 79 O'Brien, F.J., Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 2011. **14**(3): p. 88-95.
- 80 Schagemann, J.C.; Paul, S.; Casper, M.E.; Rohwedel, J.; Kramer, J.; Kaps, C.; Mittelstaedt, H.; Fehr, M.; Reinholz, G.G., Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells via biomimetic and bioactive poly-epsilon-caprolactone scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 2013. **101**(6): p. 1620-1628.
- 81 Meng, F.G.; Zhang, Z.Q.; Huang, G.X.; Chen, W.S.; Zhang, Z.J.; He, A.S.; Liao, W.M., Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in a novel hyaluronate-collagen-tricalcium phosphate scaffolds for knee repair. *European Cells and Materials*, 2016. **31**: p. 79-94.
- 82 Böck, T.; Schill, V.; Krahnke, M.; Steinert, A.F.; Tessmar, J.; Blunk, T.; Groll, J., TGF-beta1-Modified Hyaluronic Acid/Poly(glycidol) Hydrogels for Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Macromol Biosci*, 2018. **18**(7): p. e1700390.
- 83 Jung, Y.; Kim, S.H.; Kim, Y.H.; Kim, S.H., The effects of dynamic and three-dimensional environments on chondrogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Biomed Mater*, 2009. **4**(5): p. 055009.

84. Trippel, S.B.; Ghivizzani, S.C.; Nixon, A.J., Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther*, 2004. **11**(4): p. 351-359.
85. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human gene therapy*. 2010; **21**(9): p. 1045-1056.
86. Pretzel, D.; Linss, S.; Rochler, S.; Endres, M.; Kaps, C.; Alsalameh, S.; Kinne, R. W., Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2011; **13**(2):R64.
87. Alsalameh, S.; Amin, R.; Gemba, T.; Lotz, M., Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and rheumatism*. 2004; **50**(5): p. 1522-1532.
88. Hatakeyama A, Uchida S, Utsunomiya H, 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; 2017:9312329.
89. Li N, Gao J, Mi L, et al. Synovial membrane mesenchymal stem cells: past life, current situation, and application in bone and joint diseases. *Stem Cell Res Ther*. 2020; **11**(1):381.
90. Macchi V, Stocco E, Stecco C, et al. The infrapatellar fat pad and the synovial membrane: an anatomic-functional unit. *J Anat*. 2018; **233**(2): p. 146-154.
91. Huri, P.Y.; Hamsici, S.; Ergene, E.; Huri, G.; Doral, M.N., Infrapatellar Fat Pad-Derived Stem Cell-Based Regenerative Strategies in Orthopedic Surgery. *Knee Surg Relat Res*. 2018; **30**(3): p. 179-186
92. Huang, T.F.; Chen, Y.T.; Yang, T.H.; et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human anterior cruciate ligament. *Cytotherapy*. 2008; **10**(8): p. 806-814.
93. Sheng, G., The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *BMC developmental biology*. 2015; 15:44.
94. Caplan, A.I., Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem cells translational medicine*. 2017; **6**(6): p.1445-1451.
95. Steinert, A.F.; Nöth, U.; Tuan, R.S., Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury*, 2008. **39 Suppl 1**: p. 97-113.
96. Colter, D.C.; Sekiya, I.; Prockop, D.J., Identification of a subpopulation

of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(14): p. 7841-7845.

97. Sekiya, I., Larson, B.L.; Smith, J.R.; Pochampally, R.; Cui, J.-G.; Prockop, D. J., Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *STEM CELLS*, 2002. **20**: p. 530 - 541.

98. Prockop, D.J.; Gregory, C.A.; Spees, J.L., One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11917-11923.

99. Diekman, B.O.; Christoforou, N.; Willard, V.P.; Sun, H.; Sanchez-Adams, J.; Leong, K.W.; Guilak, F., Cartilage tissue engineering using differentiated and purified induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(47): p. 19172-19177.

100. Cheng, A.; Hardingham, T.E.; Kimber, S.J., Generating cartilage repair from pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014. **20**(4): p. 257-266.

101. Ko, J.Y.; Kim, K.I.; Park, S.; Im, G.I., In vitro chondrogenesis and in vivo repair of osteochondral defect with human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials*, 2014. **35**(11): p. 3571-3581.

102. Mochizuki, T.; Muneta, T.; Sakaguchi, Y.; Nimura, A.; Yokoyama, A.; Koga, H.; Sekiya, I., Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(3): p. 843-853.

103. Shirasawa, S.; Sekiya, I.; Sakaguchi, Y.; Yagishita, K.; Ichinose, S.; Muneta, T., In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem*, 2006. **97**(1): p. 84-97.

104. Yoshimura, H.; Muneta, T.; Nimura, A.; Yokoyama, A.; Koga, H.; Sekiya, I., Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*, 2007. **327**(3): p. 449-462.

- 105 Koyama, E.; Shibukawa, Y.; Nagayama, M.; Sugito, H.; Young, B.; Yuasa, T.; Okabe, T.; Ochiai, T.; Kamiya, N.; Rountree, R.B.; Kingsley, D.M.; Iwamoto, M.; Enomoto-Iwamoto, M.; Pacifici, M., A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev Biol*, 2008. **316**(1): p. 62-73.
- 106 Scotti, C.; Tonnarelli, B.; Papadimitropoulos, A.; Scherberich, A.; Schaeren, S.; Schauerte, A.; Lopez-Rios, J.; Zeller, R.; Barbero, A.; Martin, I., Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(16): p. 7251-7256.
- 107 Vinardell, T.; Sheehy, E. J.; Buckley, C. T.; Kelly, D. J., A comparison of the functionality and in vivo phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources. *Tissue Eng Part A*, 2012. **18**(11-12): p. 1161-1170.
- 108 Theoret, C.L.; Barber, S.M.; Moyana, T. Townsend, H.G.; Archer, J.F., Repair and function of synovium after arthroscopic synovectomy of the dorsal compartment of the equine antebrachiocarpal joint. *Veterinary Surgery*, 1996. **25**(2): p. 142 - 153.
- 109 Fowler, M.R.; Nathan, C.O.; Abreo, F., Synovial Metaplasia, A Specialized Form of Repair. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 2002. **126**(6): p. 727 - 730.
- 110 Pei, M.; He, F.; Vunjak-Novakovic, G., Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Differentiation*, 2008. **76**(10): p. 1044-1056.
- 111 Pei, M.; He, F.; Kish, V. L.; Vunjak-Novakovic, G., Engineering of functional cartilage tissue using stem cells from synovial lining: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res*, 2008. **466**(8): p. 1880-1889.
- 112 Elder, B.D.; Athanasiou, K.A., Hydrostatic Pressure in Articular Cartilage Tissue Engineering: From Chondrocytes to Tissue Regeneration. *TISSUE ENGINEERING*, 2009. **15**(1): p. 43 - 53.
- 113 Zhang, Y.; Chen, S.; Pei, M., Biomechanical signals guiding stem cell cartilage engineering: from molecular adaption to tissue functionality. *European Cells and Materials*, 2016. **31**: p. 59-78.
- 114 Jin, M.; Frank, E.H.; Quinn, T.M.; Hunziker, E.B.; Grodzinsky, A.J., Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*, 2001. **395**(1): p. 41-48.



- 115 Jin, M.; Emkey, G.R.; Siparsky, P.; Trippel, S.B.; Grodzinsky, A.J., Combined effects of dynamic tissue shear deformation and insulin-like growth factor I on chondrocyte biosynthesis in cartilage explants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003. **414**(2): p. 223 - 231.
- 116 Elder, B.D.; Athanasiou, K.A., Synergistic and additive effects of hydrostatic pressure and growth factors on tissue formation. *PLoS One*, 2008. **3**(6): p. e2341.
- 117 Woods, A.; Wang, G.; Dupuis, H.; Shao, Z.; Beier, F., Rac1 signaling stimulates N-cadherin expression, mesenchymal condensation, and chondrogenesis. *J Biol Chem*, 2007. **282**(32): p. 23500-23508.
- 118 Zhu, S.; Lu, P.; Liu, H.; Chen, P.; Wu, Y.; Wang, Y.; Sun, H.; Zhang, X.; Xia, Q.; Heng, B.C.; Zhou, Y.; Ouyang, H.W., Inhibition of Rac1 activity by controlled release of NSC23766 from chitosan microspheres effectively ameliorates osteoarthritis development in vivo. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(1): p. 285-293.
- 119 Parate, D.; Franco-Obregon, A.; Frohlich, J.; Beyer, C.; Abbas, A.A.; Kamarul, T.; Hui, J.H.P.; Yang, Z., Enhancement of mesenchymal stem cell chondrogenesis with short-term low intensity pulsed electromagnetic fields. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 9421.
- 120 Wang, C.J.; Hsu, S.L.; Weng, L.H.; Sun, Y.C.; Wang, F.S., Extracorporeal shockwave therapy shows a number of treatment related chondroprotective effect in osteoarthritis of the knee in rats. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2013. **14**; **Articel 44**: p. 8.
- 121 Zhang, H.; Li, Z.L.; Yang, F.; Zhang, Q.; Su, X.Z.; Li, J.; Zhang, N.; Liu, C.H.; Mao, N.; Zhu, H., Radial shockwave treatment promotes human mesenchymal stem cell self-renewal and enhances cartilage healing. *Stem Cell Res Ther*, 2018. **9**(1): p. 54.
- 122 Roseti, L.; Parisi, V.; Petretta, M.; Cavallo, C.; Desando, G.; Bartolotti, I.; Grigolo, B., Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering*, 2017. **78**: p. 1246 - 1262.
- 123 Gruene, M.; Deiwick, A.; Koch, L.; Schlie, S.; Unger, C.; Hofmann, N.; Bernemann, I.; Glasmacher, B.; Chichkov, B., Laser printing of stem cells for biofabrication of scaffold-free autologous grafts. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011. **17**(1): p. 79-87.
- 124 Roseti, L.; Cavallo, C.; Desando, G.; Parisi, V.; Petretta, M.; Bartolotti, I.; Grigolo, B., Three-Dimensional Bioprinting of Cartilage by the Use of Stem Cells: A Strategy to Improve Regeneration. *Materials (Basel)*, 2018. **11**(9).

- 125 Roubille, C.; Pelletier, J.-P.; Martel-Pekketier, J., New and emerging treatments for osteoarthritis management: will the dream come true with personalized medicine? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2013. **14**(15): p. 2059 - 2077.
- 126 Fu, W.; Xie, X.; Li, Q.; et al., Isolation, Characterization, and Multipotent Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Derived from Meniscal Debris. *Stem Cells Int.* 2016; **2016** :5093725.
- 127 Pretzel, D.; Linss, S.; Rochler, S.; Endres, M.; Kaps, C.; Alsalameh, S.; Kinne, R. W., Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2011;**13**(2):R64.
- 128 Alsalameh, S.; Amin, R.; Gemba, T.; Lotz, M., Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and rheumatism.* 2004;**50**(5):1522-1532.
- 129 Segawa, Y.; Muneta, T.; Makino, H.; Nimura, A.; Mochizuki, T.; Ju, Y.-J.; Ezura, Y.; Umezawa, A.; Sekiya, I., Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2009;**27**(4):435-441.
- 130 Garcia, J.; Wright, K.; Roberts, S.; Kuiper, J. H.; Mangham, C.; Richardson, J.; Mennan, C., Characterisation of synovial fluid and infrapatellar fat pad derived mesenchymal stromal cells: The influence of tissue source and inflammatory stimulus. *Scientific reports.* 2016;**6**:24295.
- 131 Camplejohn, K.L.; Allard, S.A., Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry.* 1988;**89**:185-188.
- 132 Friedenstein, A.J., Precursor cells of mechanocytes. *International Review of Cytology.* 1976;**47**:327-359.

## **8. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Zellkulturmedien und -zusätze

Tabelle 4: Antikörper

Tabelle 5: Enzyme

Tabelle 6: Primer

Tabelle 7: Puffer

Tabelle 8: Bausätze und Kits

Tabelle 9: Laborgeräte

Tabelle 10: Software

## **9. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Nativgewebe in HE-Färbung

Abbildung 2: Auswertung der FACS-Analyse in Form von Dot Plot Diagrammen

Abbildung 3: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung des Wachstums an Tag 7, 14 und 21 der isolierten mesenchymalen Progenitorzellen im Rahmen der adipogenen Differenzierung

Abbildung 4: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der OilRedS-Färbung und der dazugehörigen Negativkontrollen

Abbildung 5: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR Produkte der adipogenen Markergene LPL und PPAR $\gamma$ 2

Abbildung 6: Densitometrische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression der Markergene PPAR $\gamma$ 2 und LPL der adipogenen Differenzierung

Abbildung 7: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung des Wachstums an Tag 7, 14 und 21 der isolierten mesenchymalen Progenitorzellen im Rahmen der osteogenen Differenzierung

Abbildung 8: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Alizarin Rot-Färbung und der dazugehörigen Negativkontrollen

Abbildung 9: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR Produkte der osteogenen Markergene ALP, OC, Col I und Col X

Abbildung 10: Densitometrische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression der Markergene Osteocalcin, ALP, Col 1a2 und Col X der osteogenen Differenzierung

Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Alcian Blau-Färbung und der dazugehörigen Negativkontrollen im Rahmen der chondrogenen Differenzierung

Abbildung 12: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Immunhistochemischen - Färbung von Kollagen 1a1 (Col II) und der dazugehörigen Negativkontrollen

Abbildung 13: Phasenkontrastmikroskop-Aufnahmen zur Beurteilung der Immunhistochemischen - Färbung von Kollagen X (Col X) und der dazugehörigen Negativkontrollen

Abbildung 14: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR Produkte der chondrogenen Markergene SOX9, AGG und Col 1a1

Abbildung 15: Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR Produkte der chondrogenen Hypertrophiemarker OC und Col X

Abbildung 16: Densitometrische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression der Markergene AGN, Sox9 und Col 1a1 der chondrogenen Differenzierung

Abbildung 17: Densitometrische Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression der Hypertrophiemarkergene OC und Col X der chondrogenen Differenzierung

## **DANKSAGUNG**

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Andre Steinert für die Überlassung des spannenden Themas für die Dissertation sowie für die Unterstützung und Ratschläge im Verlauf der Forschung danken.

Des Weiteren gilt ein besonderer Dank auch Herrn PD Dr. Manuel Weißenberger für seine langjährige enge Betreuung während meiner Dissertation, der dafür notwendigen klinischen Forschung und für das Korrekturlesen meiner Promotionsarbeit sowie die zahlreichen Tipps, die er mir mit auf den Weg gegeben hat und seine Geduld.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Groll 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 mein wissenschaftliches Interesse zu fördern und mir die Möglichkeit geboten zu haben wissenschaftlich am König-Ludwig-Haus tätig sein zu können.

Zudem danke ich herzlichst Beate Geyer, Jutta Schneidereit sowie den anderen Mitarbeitern des wissenschaftlichen Labors, dass sie mir bei der Aufarbeitung der molekularbiologischen und histologischen Ergebnisse stets mit großer Hilfsbereitschaft zur Seite standen.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, welche immer an mich geglaubt haben und mich auf meinem gesamten Weg stets unterstützt und gefördert haben. Ohne diese großartige Unterstützung wäre all dies nicht möglich gewesen.