

Aus der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus

Lehrstuhl für Orthopädie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Chondrogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen  
zur Knorpelregeneration mittels adenoviralem Indian Hedgehog-  
Gentransfer**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Manuel Claudius Weißenberger

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2012



Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Andre Steinert

Korreferent: Prof. Dr. med. Axel Rethwilm

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2013

Der Promovend ist Arzt.

***Meiner Familie gewidmet***

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
AGN	Aggrecan
Ak	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
AnnCy3	Annexin-Cyan-3
ATP	Adenosintriphosphat
BMPs	Bone morphogenetic proteins
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CF	Carboxyfluorescein
CFDA	Carboxyfluorescein-Diacetat
CMV	Zytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Col II	Kollagen Typ II
Col X	Kollagen Typ X
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
CS-4	Chondroitin-4-Sulfat
CsCl	Cäsium-Chlorid
dest.	destilliert
DHH	Desert Hedgehog
DMMB	Dimethylmethylenblau
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
E	Wellenlänge
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1 $\alpha$	Elongation factor 1 $\alpha$
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
et al.	et altera
EtOH	Ethanol

FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FMD	Fibromodulin
g	Gramm
x g	mal Erdschwerebeschleunigung
GAGs	Glykosaminoglykane
GFP	grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HEK	Human embryonic kidney
HIF-1alpha	Hypoxie-induzierender Faktor-1alpha
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IGF	Insulin-like growth factor
IHH	Indian Hedgehog
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IVP	infektiöse Viruspartikel
kbp	Kilobasenpaare
L	Liter
MDB	Membrane desalting buffer
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OC	Osteocalcin

OD	Optische Dichte
OP	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
Ptc	Patched
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RLU	relative Lichteinheiten
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
SCM	Stammzellmedium
SHH	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SOX-9	SRY-related high mobility group box-9
SuFu	Suppressor des Fused-Proteins
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
ü.	über
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/mL	Einheiten pro Milliliter
V	Volt
z. B.	zum Beispiel
Zfp521	Zinkfingerprotein 521
ZnCl <sub>2</sub>	Zink-Chlorid

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Knorpeldefekte, aktueller Stand und Grenzen der derzeitigen Behandlungsverfahren	1
1.2	Mesenchymale Stammzellen	3
1.2.1	Definition und Plastizität von mesenchymalen Stammzellen	3
1.2.2	Mesenchymale Stammzellen für die Knorpelregeneration	4
1.3	Wachstumsfaktoren für die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen	5
1.3.1	Signalwege für die Knorpelregeneration	6
1.3.2	IHH/PTHrP-Signalweg	7
1.4	Gentransfer zur Knorpelregeneration	10
1.4.1	Nicht-viraler Gentransfer in mesenchymale Stammzellen zur Knorpelregeneration	10
1.4.2	Viraler Gentransfer in mesenchymale Stammzellen zur Knorpelregeneration	11
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1	Material	14
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.3	Zellkulturmedien und -zusätze	17
2.1.4	Wirtszellen	17
2.1.5	Antikörper	18
2.1.6	Enzyme	18
2.1.7	In adenovirale Vektoren eingebaute Gene	18
2.1.8	Primer	18
2.1.9	Puffer- und andere Lösungen	19
2.1.10	Bausätze	21
2.1.11	Geräte	21

2.1.12	Software und Onlinedatenquellen	23
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
2.2.1	Zellkultur und Transduktion	23
2.2.1.1	Isolierung und Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen	23
2.2.1.2	Herstellung rekombinanter Adenoviren mittels Cre/loxP-Rekombination	24
2.2.1.3	Vermehrung und Aufreinigung adenoviraler Vektoren	25
2.2.1.4	Titerbestimmung adenoviraler Vektoren	26
2.2.1.5	Infektion der humanen mesenchymalen Stammzellen mit adenoviralen Vektoren	27
2.2.1.6	Pelletherstellung und Kultur	28
2.2.2	Molekularbiologische Untersuchungen	29
2.2.2.1	Transgenexpression (IHH-, TGF- $\beta$ 1-, BMP-2-ELISA)	29
2.2.2.2	Quantitative DNA-Bestimmung	30
2.2.2.3	Quantitative Glykosaminoglykan-Bestimmung	30
2.2.2.4	Quantitative Adenosintriphosphat-Bestimmung	31
2.2.2.5	Quantitative Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase	31
2.2.3	Histologische Untersuchungen	32
2.2.3.1	Fixierung und Paraffineinbettung	32
2.2.3.2	Herstellung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung	33
2.2.3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
2.2.3.4	Alcian Blau-Färbung	34
2.2.3.5	Alkalische Phosphatase-Färbung	34
2.2.3.6	Immunhistochemische Färbungen	35
2.2.3.6.1	Kollagen Typ II-Färbung	36
2.2.3.6.2	Kollagen Typ X-Färbung	36
2.2.3.6.3	Chondroitin-4-Sulfat-Färbung	37
2.2.3.7	Zweifach-Fluoreszenzfärbung Annexin V-Cy3/6-CFDA	37
2.2.4	Genexpressionsanalyse	37
2.2.4.1	RNA-Isolation	37
2.2.4.2	cDNA-Synthese	38
2.2.4.3	Semiquantitative RT-PCR	39
2.2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.4.5	Quantitative RT-PCR	41
2.2.5	Statistische Auswertung	42
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
3.1	Morphologie und Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen in Monolayer und Pelletkultur	43

<b>3.2</b>	<b>Bestimmung der Transgenexpression</b>	<b>44</b>
3.2.1	Quantitative Bestimmung der Transgenexpression von IHH, TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 mittels ELISA	44
3.2.2	Qualitative Bestimmung der Transgenexpression von SOX-9 mittels Fluoreszenzmikroskopie	46
<b>3.3</b>	<b>Quantitative Bestimmung der Zellproliferationsrate mittels Adenosintriphosphat-Assay</b>	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>Quantitative Bestimmung der Zellvitalität mittels DNA-Assay</b>	<b>48</b>
<b>3.5</b>	<b>Quantitative Bestimmung des Glykosaminoglykan-Gehaltes mittels DMMB</b>	<b>49</b>
<b>3.6</b>	<b>Chondrogene Differenzierung</b>	<b>51</b>
3.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	51
3.6.2	Alcian Blau-Färbung	53
3.6.3	Immunhistochemische Kollagen Typ II-Färbung	54
3.6.4	Immunhistochemische Chondroitin-4-Sulfat-Färbung	56
3.6.5	Semiquantitative und quantitative RT-PCR von knorpelspezifischen Genen	58
<b>3.7</b>	<b>Chondrogene Hypertrophie</b>	<b>61</b>
3.7.1	Alkalische Phosphatase-Assay	61
3.7.2.	Alkalische Phosphatase-Färbung	62
3.7.3	Immunhistochemische Kollagen Typ X-Färbung	64
3.7.4	Semiquantitative und quantitative RT-PCR von hypertrophiespezifischen Genen	66
<b>3.8</b>	<b>Zellvitalität und Apoptose</b>	<b>69</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion von Material und Methoden</b>	<b>71</b>
4.1.1	Primäre Zellen versus Zelllinien	71
4.1.2	Pelletsystem versus andere dreidimensionale Kulturverfahren	71
4.1.3	Gentherapie versus Wachstumsfaktorapplikation	72
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>73</b>
4.2.1	Transgenexpression	73
4.2.2	Chondrogene Differenzierung	73

4.2.3	Hypertrophe Differenzierung	74
4.2.4	Zellproliferationsraten	76
<b>4.3</b>	<b>Vergleich mit entwicklungsbiologischen Studien</b>	<b>77</b>
<b>4.4</b>	<b>Vergleich mit anderen in vitro-Studien zur Knorpelregeneration</b>	<b>80</b>
<b>4.5</b>	<b>Vergleich mit in vivo-Studien zur Knorpelregeneration</b>	<b>83</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>99</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>102</b>

Danksagung

Lebenslauf

# 1 Einleitung

## 1.1 Knorpeldefekte, aktueller Stand und Grenzen der derzeitigen Behandlungsverfahren

Der hyaline Gelenkknorpel ist wegen seiner hohen Belastungs- und Gleitfähigkeit das entscheidende lasttragende System diarthrodialer Gelenke [1-2]. Aufgrund der auf ihm ruhenden, enormen biomechanischen Beanspruchung ist dieses ausdauernde und widerstandsfähige Gewebe zahlreichen möglichen Schädigungen ausgesetzt. Knorpelläsionen treten als Folge von Krankheiten, wie Osteochondrosis dissecans oder Osteoarthrose, sowie akuten Gelenktraumata auf, wobei der hyaline Gelenkknorpel selbst aber nur begrenzte Möglichkeiten der Eigenreparatur und Regeneration aufweist [3-4]. Knorpeldefekte, die nicht den subchondralen Knochen erreichen, haben keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem, da hyaliner Gelenkknorpel selbst keine eigene Gefäßversorgung besitzt und vermutlich über Diffusion durch die Knorpelmatrix mit Nährstoffen versorgt wird [5]. Folglich können die zur Regeneration benötigten Chondroprogenitorzellen aus dem Blut oder Knochenmark nicht in die Defektregion einwandern und die Reparaturvorgänge vor Ort beeinflussen [5-6]. Der Knorpeldefekt wird also nicht mit Reparaturgewebe aufgefüllt und bleibt in der Folgezeit bestehen [1-2]. Erreicht der Knorpeldefekt den subchondralen Knochen und damit den Anschluss an das Blutsystem des Knochenmarkes, können letztlich Gefäßsystem-vermittelt durch ein initiales Rupturhämatom und verschiedene Wachstumsfaktoren, wie den Platelet-derived growth factor (PDGF) und Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , mesenchymale Stammzellen in den Defekt einwandern und im Idealfall zu Chondrozyten differenzieren, die eine an Kollagen Typ I (Col I) reiche, faserknorpelige Matrix synthetisieren, welche jedoch mechanisch minderwertige Eigenschaften vorweist [1-2, 7].

Adulte, in der extrazellulären Matrix eingebettete Chondrozyten sind zur Migration kaum befähigt. Zudem ist Knorpel von Natur aus ein bradytrophes Gewebe, das über eine nur sehr geringe metabolische Aktivität und damit über eine stark begrenzte Regenerationsfähigkeit verfügt. Das durch subchondrale Defekte selbst oder durch therapeutische, knochenmarkstimulierende Eingriffe, wie die Abrasionsplastik, Pridie-Bohrung oder Mikrofrakturierung [8-10],

erzeugte Faserknorpelgewebe ist letztlich nur ein biomechanisch und biochemisch minderwertiges Ersatzgewebe mit veränderter Faserarchitektur und Morphologie, das über die Zeit degeneriert und schließlich zu einer vorzeitigen Arthroseentstehung führen kann [2, 11-12].

Daher ist es bis heute immer noch eines der obersten Ziele der orthopädischen Forschung und Behandlung, hyalines oder zumindest hyalin-ähnliches Knorpelgewebe herzustellen. Diesem Ziel zufolge wurde eine Vielzahl von Ansätzen getestet. Ein möglicher Therapieversuch bei der Behandlung von Knorpeldefekten besteht in der Transplantation von Zellen oder zellreichen Geweben in das Defektareal. Die Transplantation von Perichondrium oder Periost in vivo führt allerdings zu schlechten klinischen Resultaten und zu Problemen, wie z. B. der Periostlappenhypertrophie [1-2, 7]. Des Weiteren zeigen diese Therapieversuche oftmals nur kurzlebige Effekte bei einer gewissen Anzahl der behandelten Patienten, erzeugen keinen langlebigen, hyalinen Knorpel und eignen sich nur für die Behandlung kleinerer Knorpeldefekte [2, 7, 13-15]. Daher wird seit 1987 die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) in Kombination mit einer periostalen Abdeckung zur Behandlung von größeren Knieknorpeldefekten mit guten Ergebnissen klinisch angewendet [16-23]. Moderne Varianten der ursprünglichen ACT betten die Chondrozyten vor Transplantation in den Knorpeldefekt in eine dreidimensionale Matrix ein [23-26]. Zwar führen all diese in der klinischen Anwendung befindlichen Verfahren oftmals zu einer Beschwerdebesserung bei einigen Patienten, langzeitstabiles, hyalines Regeneratgewebe wurde allerdings bis heute klinisch nicht erzeugt [1-2, 17-18]. Hierfür gibt es eine Vielzahl an Gründen: Differenzierungs- und Integrationsinsuffizienz, Matrixdegradation sowie Verlust der transplantierten Zellen oder Gewebe in vivo [27-28]. Dafür verantwortlich sind vor allem Mechanismen wie Seneszenz, Hypertrophie, Apoptose, Nekrose sowie Inflammation der transplantierten Zellen bzw. Gewebe in situ und auch das Fehlen entsprechender Wachstumsfaktoren in ausreichender Konzentration vor Ort im Bereich des Knorpeldefektes [27-29].

Als interessante Alternative zu den Chondrozyten in der ACT haben heute zur Behandlung von größeren Knorpeldefekten ex vivo kultivierte und in ein dreidimensionales Gelkonstrukt eingebrachte, adulte mesenchymale

Stammzellen (MSCs) Einzug in den klinischen Alltag gehalten [30-32]. Um jedoch MSCs in Richtung Knorpel zu differenzieren, sind Differenzierungsfaktoren notwendig, von denen in bisherigen Versuchen unter anderem die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie, der PDGF, Vertreter der Fibroblast growth factor (FGF)-Familie, der Insulin-like growth factor (IGF) mit vielen anderen untersucht wurden [33-35]. Von besonderem Interesse hinsichtlich der chondrogenen Differenzierung von MSCs sind auch Modulatoren der osteogenen oder hypertrophen Differenzierung, wie z. B. Indian Hedgehog (IHH) oder Parathyroid hormone-related protein (PTHrP), sowie Antagonisten, welche die Apoptose, Seneszenz und Freisetzung kataboler Zytokine hemmen können [27]. In einer in vitro-Studie von Kellner et al. konnte bereits gezeigt werden, dass Hedgehog-Proteine, sowohl IHH als auch Sonic Hedgehog (SHH), einen positiven Einfluss auf die Knorpelerzeugung im Bereich des Tissue Engineerings, insbesondere hinsichtlich der Zellproliferationsraten, der biochemischen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der kultivierten Chondrozyten sowie des morphologischen Erscheinungsbildes, ausüben [36]. Vor diesem Hintergrund war es Ziel meiner Doktorarbeit, den Einfluss des IHH-Gentransfers in MSCs in vitro zu untersuchen.

## **1.2 Mesenchymale Stammzellen**

### **1.2.1 Definition und Plastizität von mesenchymalen Stammzellen**

MSCs sind multipotente Vorläuferzellen von Knorpel-, Knochen-, Sehnen-, Muskel-, Fett- und Nervengewebe sowie von Knochenmarkstroma [37-42], deren Gewinnung aus dem Knochenmark einfach [43-44] und deren Kultivierung unkompliziert ist [28, 37, 44-46]. Ihre Differenzierung wird durch Signale aus der unmittelbaren Umgebung in vivo bzw. durch die Kulturbedingungen in vitro vorangetrieben. Verschiedene Stimuli, wie z. B. Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen, können die Differenzierungsvorgänge beeinflussen [46-47]. Von entscheidender Bedeutung allerdings für die chondrogene Differenzierung von MSCs scheinen vor allem verschiedene Wachstumsfaktoren und Hormone zu sein, wie TGF- $\beta$  und IGF, welche in den Differenzierungsprozess der MSCs einzugreifen vermögen [48-51].

Um in zukünftigen Forschungsarbeiten Aussagen über MSCs vergleichbar zu machen, wurden von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) Minimalkriterien vorgeschlagen, welche charakteristisch für die aus dem Knochenmark isolierten, mesenchymalen Stromazellen sind [52-53]. Dabei erfüllen humane mesenchymale Stromazellen (entsprechen den humanen mesenchymalen Stammzellen) drei Hauptkriterien: Sie müssen plastikadhärent [54] in Kulturflaschen unter Standardkulturbedingungen sein, ein spezifisches Muster an Oberflächenantigenen vorweisen sowie multipotent zu differenzieren sein [52-53]. Über 95% der kultivierten Zellen müssen CD105, CD73 sowie CD90 aufweisen und dahingegen dürfen nur weniger als 2% hämatopoetische Antigene, wie CD45 oder CD34, exprimieren [52-53]. Zusätzlich müssen die kultivierten Zellen unter Standardkulturbedingungen in vitro in Chondroblasten, Osteoblasten und Adipozyten differenzierbar sein [52-53].

### **1.2.2 Mesenchymale Stammzellen für die Knorpelregeneration**

Da MSCs auf der einen Seite leicht isoliert sowie kultiviert werden können und auf der anderen Seite ein großes Differenzierungspotential in sich bergen, eignen sie sich besonders für zellbasierte Verfahren des Tissue Engineerings im Bereich der Knorpelreparatur [55]. Johnstone et al. konnten im Jahre 1998 MSCs von Kaninchen mithilfe von TGF- $\beta$ 1 in vitro chondrogen differenzieren [48, 56]. Dabei zeigten insbesondere MSCs aus dem Knochenmark eine stark ausgeprägte Fähigkeit, chondrogen zu differenzieren [57-59].

Zur Erzeugung von langlebigem, hyalinem Knorpelgewebe unter therapeutischer Verwendung von MSCs scheint es von entscheidender Bedeutung zu sein, am Ort des Knorpeldefektes entsprechende Umgebungsbedingungen zu schaffen, die einerseits eine Induktion von Chondrogenese und andererseits den Erhalt eines chondrogenen Phänotyps der enddifferenzierten MSCs möglich machen [28, 60-61]. Um das Differenzierungsverhalten und -potential von MSCs im Zuge der Knorpelregeneration besser zu verstehen, können vor allem die verschiedenen Stadien der Skelettentwicklung während der endochondralen Ossifikation Aufschluss über die streng regulierten Schritte während der Knorpelerzeugung in vitro geben [47, 56]. Insbesondere das Pelletkultursystem kann dabei das

Phänomen der Chondrogenese im Zuge der Differenzierung von MSCs verständlicher machen [62].

Eine weitere, neben der Identifizierung entsprechender Wachstumsfaktoren und Modulatoren der chondrogenen Differenzierung sowie einer geeigneten Verteilungsmethode der selbigen, große Hürde bei der Erzeugung von hyalinem Ersatzknorpelgewebe stellt das Phänomen der chondrogenen Hypertrophie dar: Diese wurde bereits in in vitro- und in vivo-Vorversuchen unter Verwendung von MSCs vor allem bei verschiedenen Vertretern aus der Gruppe der Bone morphogenetic proteins (BMPs) beobachtet [27-28, 63-65]. Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Vorversuche wird ersichtlich, dass durch die Verwendung von verschiedenen Regulatoren der Chondrogenese, wie etwa BMP-2, nicht nur eine chondrogene Differenzierung von MSCs erreicht werden kann, sondern dafür auch Phänomene, wie die Hypertrophie, Apoptose oder das Endstadium der Chondrozytenreifung, in Kauf genommen werden müssen. Diese Phänomene treten physiologischerweise bei der endochondralen Ossifikation in der Wachstumsfuge während der Extremitätenentwicklung auf, sind jedoch unerwünscht bei der Reparatur von Knorpeldefekten in vivo [28]. In diesem Zusammenhang gewinnen bei der Entwicklung von mit MSCs arbeitenden Therapieverfahren zur Knorpelregeneration Modulatoren der chondrogenen Hypertrophie in der Wachstumsfuge, wie etwa IHH oder PTHrP [66-69], an Bedeutung. Das Phänomen der Chondrogenese zusammen mit der dabei auftretenden Hypertrophie wurde bereits in in vitro-Vorversuchen mit primären MSCs nach adenoviralem Gentransfer von TGF- $\beta$ 1 und verschiedenen BMPs untersucht [27, 63, 70].

### **1.3 Wachstumsfaktoren für die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen**

Im Bereich der Wachstumsfuge spielen während der endochondralen Ossifikation mehrere Wachstumsfaktoren als Signalmoleküle eine entscheidende Rolle, welche die Chondrozytenproliferation und -differenzierung lokal vor Ort regulieren können [71-72]. Die wichtigsten und am besten untersuchten Vertreter aus diesem Bereich sind IHH, PTHrP, die Familie der FGFs, IGF-I, die TGF- $\beta$ -Superfamilie sowie Transkriptionsfaktoren wie SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX-9) [71-72]. Im Folgenden sollen die

einzelnen Wachstumsfaktoren und deren Funktion während der Skelettentwicklung und des Knochenwachstums kurz dargestellt werden.

### **1.3.1 Signalwege für die Knorpelregeneration**

Die Familie der FGFs wird aus mindestens 22 verschiedenen Genen mit vier dazugehörigen FGF-Rezeptorgenen gebildet [71-72], die entscheidende Regulatoren während der embryonalen Knochenentwicklung darstellen [73-74]. Eine Studie von Minina et al. konnte zeigen, dass FGFs sowohl das Auftreten als auch die Geschwindigkeit der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge beschleunigen [75]. Zudem konnte herausgearbeitet werden, dass FGFs und BMPs sich antagonistisch in der Regulierung der Chondrozytenproliferation, IHH-Expression und in dem Vorgang der hypertrophen Differenzierung verhalten und somit in einem fein abgestimmten Verhältnis zueinander den Differenzierungsvorgang der Chondrozyten auf deren Proliferationsrate abstimmen können [75].

IGF-1 ist ein weiteres wichtiges Signalmolekül innerhalb der Chondrogenese und des Knochenwachstums, wie in einer in vivo-Studie von Baker et al. demonstriert werden konnte, in der Mäuse mit einer IGF-1-Nullmutation eine deutliche Knochenwachstumsretardierung vorwiesen [76]. Zudem konnten MSCs in einer in vitro-Studie von Worster et al. mittels IGF-1 chondrogen differenziert werden [51] und deren Pelletgröße sowie Proteoglykansynthese ähnlich stark wie durch TGF- $\beta$ 1 gesteigert werden [49].

Unter der TGF- $\beta$ -Superfamilie werden TGF- $\beta$  selbst sowie die verschiedenen Vertreter aus der Gruppe der BMPs subsumiert. TGF- $\beta$  gilt als ein entscheidender stimulierender Faktor für die chondrogene Differenzierung von MSCs und für deren Synthese von Knorpel-assoziierten Matrixmolekülen, wie Col II und zahlreichen Proteoglykanen [48, 51, 70, 77-80]. Ebenso werden auch die verschiedenen BMP-Moleküle als entscheidende Signalmoleküle innerhalb der Chondrogenese während der endochondralen Ossifikation und für die chondrogene Differenzierung von MSCs angesehen [81-88]. Interessanterweise können TGF- $\beta$ s und BMPs sowohl unabhängig von dem IHH/PTHrP-Signalweg [89] Einfluss auf die Chondrozytenproliferation und -differenzierung nehmen als auch in einem IHH/PTHrP-abhängigen Signalweg einzelne Schritte der endochondralen Ossifikation regulieren [90].

SOX-9 ist entscheidend im Zuge der endochondralen Ossifikation daran beteiligt, MSCs aus dem Kondensationsstadium zu Chondrozyten differenzieren zu lassen [71]. Derzeit werden 20 verschiedene SOX-Transkriptionsfaktoren, welche ursprünglich in dem das männliche Geschlecht festlegenden Transkriptionsfaktor SRY entdeckt wurden und zugleich die sogenannte high-mobility box (HMG) enthalten, unterschieden [91]. SOX-9 wird von MSCs im Kondensationsstadium und von proliferierenden Chondrozyten exprimiert, nicht jedoch von hypertrophen Chondrozyten [71]. Zudem steigert SOX-9 selbst die Synthese knorpelspezifischer Matrixproteine, wie Col II und Aggrecan (AGN) [68, 71, 92]. Man geht derzeitig davon aus, dass SOX-9 sowohl für den Vorgang der Kondensation und Differenzierung der MSCs als auch für die Inhibierung der hypertrophen Umwandlung der proliferierenden Chondrozyten unerlässlich ist [91, 93]. Aus diesen Gründen wird SOX-9 als ein Hauptregulator der Chondrogenese angesehen [91].

### **1.3.2 IHH/PTHrP-Signalweg**

Das Signal von IHH wird letztlich über die beiden Rezeptoren Patched (Ptc) und Smoothed (Smo) in das Zellinnere weitergeleitet [71-72]. Dort werden dann verschiedene Hedgehog-Zielgene an- bzw. abgeschaltet [94]. IHH reguliert somit auf einem PTHrP-unabhängigen Weg und zusätzlich in einem negativen Rückkopplungskreis mit PTHrP die Chondrozytenproliferation und Chondrozytendifferenzierung sowie die Osteoblastendifferenzierung und stellt somit ein wichtiges Bindeglied zwischen Chondro- und Osteogenese in der Wachstumsfuge dar [72, 95-96].

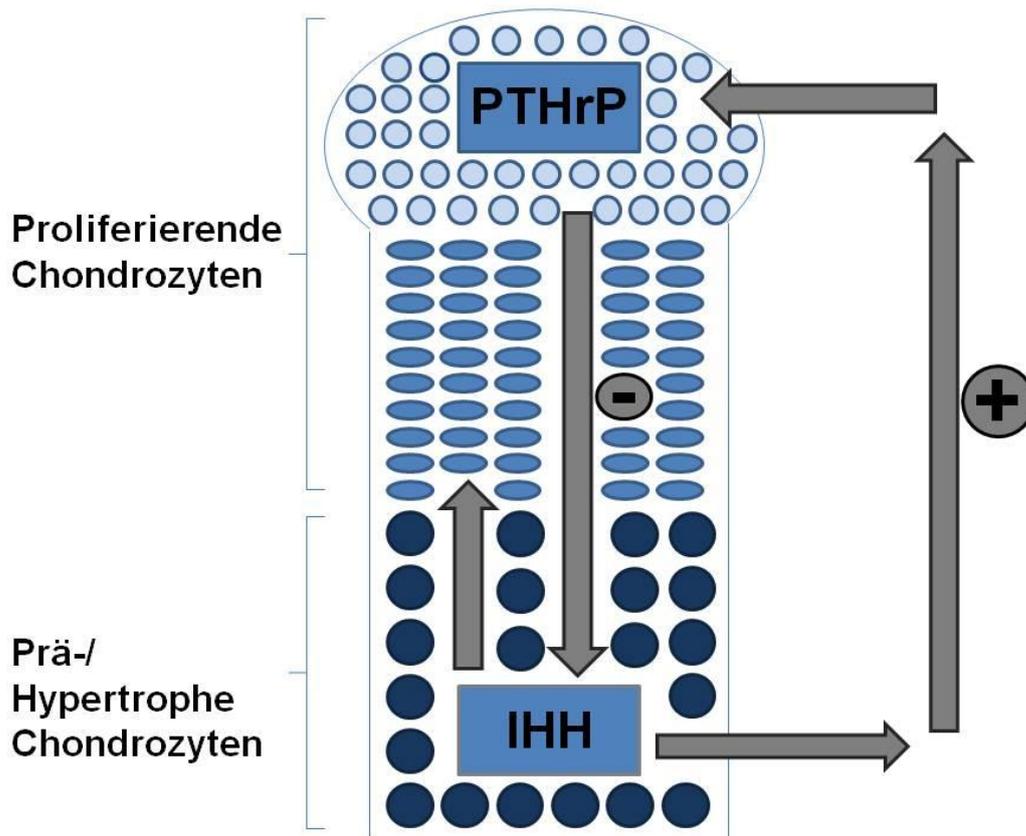
Diese Dissertationsschrift soll den Einfluss von IHH auf die chondrogene Differenzierung von MSCs mittels adenoviralem Gentransfer von IHH-cDNA und eine mögliche Modulation der Hypertrophie der differenzierten Zellen untersuchen.

Erstmals entdeckt wurde das Hedgehog-Gen im Jahre 1980 im Zuge von genetischen Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*-Mutanten [97]. IHH selbst zählt bei den Säugetieren neben weiteren Vertretern, wie SHH und Desert Hedgehog (DHH), zu der Hedgehog-Proteinfamilie [66, 98-99].

Es konnte gezeigt werden, dass der Hedgehog-Signalweg entscheidend an der Entwicklung von bestimmten Geweben während der Embryogenese beteiligt ist.

In Wirbeltieren werden über den Hedgehog-Signalweg unter anderem die Organogenese, Spermatogenese und Chondrogenese beeinflusst [98]. Hedgehog-Proteine sind aus mehreren verschiedenen Domänen aufgebaut: einem Signalpeptid zur Proteinausschleusung aus der Zelle, einer abgesonderten aminoterminalen Domäne, die als Signalmolekül fungiert, und einer autokatalytischen, carboxyterminalen Domäne, welche letztlich die aminoterminalen Domäne freisetzt [99]. Durch eine Cholesterolanlagerung an das carboxyterminale Ende des Signalmoleküls sowie weitere lipophile Veränderungen am Amino-Terminus kann das Signalmolekül mit Lipoproteinen im Bereich der Zellmembran in Kontakt treten [36, 99-102]. Die Signaltransduktion in das Zellinnere erfolgt schließlich über den Rezeptor Ptc sowie den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Smo, der über eine Kaskade von Mikrotubulus-assoziierten Proteinen das Signal an den Zellkern weiterleitet. Dort werden Hedgehog-Zielgene durch Gli-Transkriptionsfaktoren an- oder ausgeschaltet [67, 98-99].

IHH kann als ein Schlüsselfaktor in der endochondralen Ossifikation in der Wachstumsfuge während der Extremitätenentwicklung der Vertebraten angesehen werden [66, 98]. Dabei wird IHH vor allem von den prähypertrophen Chondrozyten sezerniert, die eine Verbindung zwischen den proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten darstellen. IHH reguliert somit zusammen mit PTHrP durch einen negativen Rückkopplungskreis die Chondrozytenproliferation und -differenzierung in der Wachstumsfuge [66, 95].



**Abb. 1: Negativer IHH/PTHrP-Rückkopplungsmechanismus (nach Kronenberg, Developmental regulation of the growth plate)**

PTHrP wird insbesondere von den periartikulären Chondrozyten synthetisiert und sezerniert. PTHrP hemmt die Chondrozytendifferenzierung in Richtung der postmitotischen, hypertrophen Chondrozyten und sichert damit den Bestand an proliferierenden Chondrozyten mit hohem mitotischem Index [66, 103]. Werden Chondrozyten nicht mehr ausreichend durch PTHrP stimuliert, treten sie in den hypertrophen Differenzierungsprozess ein, exprimieren IHH und werden damit zu sogenannten prähypertrophen Chondrozyten [66, 71]. IHH unterhält die Chondrozytenproliferation durch direkte Stimulation der proliferierenden Chondrozyten sowie durch positive Regulierung des PTHrP-Signales und ist somit entscheidend für das Längenwachstum des Knochens verantwortlich [66, 71, 96, 103].

Zusammenfassend spiegeln diese Erkenntnisse das Modell der Interaktion von IHH und PTHrP in einem negativen Rückkopplungskreis wider: In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass die von den prähypertrophen Chondrozyten produzierte Menge an IHH die Zahl der hypertroph differenzierenden Zellen repräsentiert. Diese Menge an gebildetem IHH-Protein

führt wiederum zu einer proportional abhängigen Menge an PTHrP im periartikulären Perichondrium, welche letztlich die Chondrozytendifferenzierung hemmt. Sind die prähypertrophen Chondrozyten in der Differenzierung zu den hypertrophen Chondrozyten vorangeschritten, wird die IHH-Expression herunterreguliert. Durch Abfall der IHH-Proteinkonzentration nimmt die Bildung von PTHrP ebenfalls ab, was zu einem erneuten Einsetzen der Chondrozytendifferenzierung und zu einem Wiederanstieg der IHH-Expression durch die prähypertrophen Chondrozyten führt [66].

## **1.4 Gentransfer zur Knorpelregeneration**

Eine der großen Hürden bei der chondrogenen Differenzierung der in vivo transplantierten MSCs bleibt immer noch die unzureichende Bereitstellung der oben erwähnten Wachstumsfaktoren für die Reparaturprozesse innerhalb des Knorpeldefektes vor Ort. Ein eleganter Versuchsansatz aus dem Bereich der zellbasierten Gentherapie arbeitet mit MSCs als Träger chondroinduktiver Gene: Durch die Übertragung der entsprechenden cDNA auf die MSCs mittels spezieller Vektoren wird die Synthese benötigter Wachstumsfaktoren sowie anderer Genprodukte vor Ort in vivo möglich gemacht [104]. Erstmals klinisch im muskuloskelettalen System eingesetzt wurde die Gentherapie zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis von Evans et al. [105-107]. Die Versuchsansätze der Gentherapie wurden des Weiteren auch in zahlreichen tierexperimentellen in vitro-Studien exploriert [27, 108-109].

### **1.4.1 Nicht-viraler Gentransfer in mesenchymale Stammzellen zur Knorpelregeneration**

Nicht-virale Vektoren stellten sich in bisherigen Versuchen als besonders sicher und einfach zu handhaben heraus, sind aber im Gegensatz zu viralen Vektoren längst nicht so effektiv bezüglich der Transduktionsrate und weisen selbst inflammatorische Eigenschaften in situ auf [27].

Unter dem Begriff der chemischen Methoden werden die sogenannten nicht-viralen Plasmidvektoren zusammengefasst. Dabei gibt es neben den synthetisch oder natürlich hergestellten, polymerbasierten Vektoren insbesondere die liposombasierten Vektoren. Als Nachteile der liposom-

basierten Vektoren sind vor allem die geringe Transduktionsrate und die zytotoxischen Eigenschaften dieser Genträger zu nennen [27, 110]. Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass durch einen Lipid-vermittelten Gentransfer in vivo eine für die Wirkung eines Proteins ausreichende Transgenexpression in der transfizierten Zelle erreicht werden kann [111].

Neben diesen plasmidvektorbasierten, nicht-viralen Verfahren sind auch noch die sogenannten physikalischen Methoden, die letztlich ebenso zu den nicht-viralen Vektoren gerechnet werden, zu nennen. Zu dieser Art von nicht-viralen Vektoren werden unter anderem die Technik der Elektroinkorporation, der Sonoinkorporation oder auch der direkten DNA-Injektion in eine Zielzelle gerechnet: Auch die physikalischen Methoden bieten ebenso wie die plasmidbasierten Vektoren im Vergleich zu den viralen Vektoren den Vorteil, dass sie nicht-infektiös sind und damit in geringerem Ausmaß die Zellvitalität der transfizierten Zellen und deren multipotente Differenzierungsmöglichkeiten beeinflussen [27, 110]. Allen nicht-viralen Vektoren, sowohl den chemischen als auch den physikalischen Verfahren, ist gemeinsam deren deutlich geringere Transduktionseffektivität im Vergleich zu den viralen Vektoren, wobei die Transduktionseffektivität nur ein wichtiger Faktor bei der Knorpelgewebeerstellung ist [110].

#### **1.4.2 Viraler Gentransfer in mesenchymale Stammzellen zur Knorpelregeneration**

Für den viralen Gentransfer kommen verschiedene Virusfamilien in Betracht. Nachteilig bei vielen Vektoren aus der Familie der Retroviren, wie z. B. Foamyviren oder die Subgattung der Lentiviren, ist ihre potentiell mutagene Wirkung durch Integration in das Wirtsgenom [112]. Im Gegensatz dazu tritt bei der Familie der Adenoviridae das Phänomen der Insertionsmutagenese nicht auf. Dafür sind sie jedoch immunogen und in hohen Dosen zytotoxisch. Da adenovirale Vektoren zu den nicht-integrierenden Vektorsystemen gerechnet werden und somit lediglich ihr virales Genom als Episom im Zellkern der Wirtszelle ablagern, wird beim Kopiervorgang einer sich teilenden, infizierten Zelle die virale DNA nicht mitabgelesen, was schließlich den langfristigen Therapieeffekt eines nicht-integrierenden Vektorsystems einschränkt [113].

Die bereits in klinischer Anwendung stehenden Adenovirus-abgeleiteten Vektoren zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass sie sowohl sich teilende als auch nicht-teilende Zellen verschiedener Art *in vitro* und *in vivo* mit einer hohen Transduktionseffizienz infizieren können, im Anschluss daran eine hohe Transgenexpression in der Wirtszelle induzieren und zudem hochtitrig angezüchtet werden können [27]. Adenoviren gehören zu den nicht-behüllten, doppelsträngigen DNA-Viren, deren Genom in linearer Form in einem ikosaedrischen Kapsid vorliegt und eine Länge von 32-36 Kilobasenpaare (kbp) vorweist [114]. Das Kapsid selbst besteht aus Penton- und Hexonkapsomeren, die wiederum aus zahlreichen unterschiedlichen Proteinen aufgebaut werden. Die der Gattung Mastoadenovirus angehörenden, humanen Adenoviren erzeugen beim Menschen vor allem Erkrankungen des Respirationstraktes [115]. Infiziert das Adenovirus eine Wirtszelle, so schleust es seine Erbinformation in Form eines Plasmids in die Zelle ein, ohne dass dieses in das Wirtsgenom integriert [27]. Dadurch wird das Wirtsgenom nicht verändert. Ein großer Nachteil der nicht-mutagen wirkenden Adenoviren ist allerdings ihre hohe Immunogenität in *in vivo*-Versuchen [113]. Vor allem bei hohen Viruskonzentrationen im Zuge einer Infektion kann es zu systemischen Immunreaktionen des Wirtsorganismus kommen. Dieser Nachteil der adenoviralen Vektoren der ersten und zweiten Generation ist bei Vertretern der dritten Generation ausgeschaltet worden, indem alle kodierenden viralen Sequenzen aus dem Virusgenom eliminiert wurden. Zuerst wurden hierfür mittels Cre/loxP-Rekombination rekombinante Adenoviren entwickelt, deren „Packing“-Eigenschaft bei Erhalt aller anderen Virusfunktionen ausgeschaltet wurde. Diese neu hergestellten Viren sind also nicht mehr in der Lage, ihre replizierte DNA aus der infizierten Wirtszelle auszuschleusen, um neue infektiöse Viruspartikel freizusetzen. „Gutless“- oder „High capacity“-Vektoren haben alle kodierenden viralen Sequenzen verloren, sind replikationsdefizient und benötigen daher bei ihrer Herstellung eine Helferzelllinie, welche die für die virale Replikation notwendigen Proteine bereitstellt, und ein Rekombinationsplasmid, was die Herstellung der Vektoren entsprechend komplex werden lässt.

Vor dem Hintergrund der in der Literatur bisher noch wenig beleuchteten Wirkungsweise von IHH im Kontext mit der Knorpelregeneration ist es Ziel

dieser Studie, die Funktion von IHH auf die chondrogene Differenzierung von MSCs in einem Pelletkultursystem in vitro zu untersuchen. Zur effektiven Darreichung von IHH wurde ein adenovirales Gentransfersystem generiert, welches die kodierende Sequenz des humanen IHH-Gens beinhaltet. Mit diesem System wurde untersucht, ob adenoviraler IHH-Gentransfer in der Lage ist, humane MSCs in Pelletkultur chondrogen zu differenzieren sowie eine in Vorversuchen aufgetretene chondrogene Hypertrophie der differenzierten MSCs zu modulieren [63, 70].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Deckplättchen	Marienfeld Laboratory Glasware, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
20-Gauge-Nadel	B. Braun, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Objektträger	Marienfeld Laboratory Glasware, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pasteurpipetten	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
PCR-Gefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Brandt, gekauft bei Laug & Scheller GmbH, Kürnach, Deutschland
Plastikpipetten (serologisch)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Skalpell	Bayha, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Sterile Filter (0,2 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
UVetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
96-well Assay-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche (175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche (25 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup> )	TPP, gekauft bei Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb (70 µm)	BD Falcon, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 1: Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Agar	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose (Mehrzweck-)	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Alcian Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland

Amylacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antikörper-Verdünnungspufferlösung	DCS, Hamburg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
4', 6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydro-chlorid (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
dNTP-Mix	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Dulbecco's Phosphat-gepuffertes Pulversalz (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Ethanol (denaturiert)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Tetranatriumsalzhydrat	Calbiochem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Fluoromount-G™	SouthernBiotech, gekauft bei Biozol, Eching, Deutschland
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HPLC-Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hydrochloridsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ITS-plus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbatsäure-2-Phosphat Sesquimagnesiumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
LE-Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Levamisol	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Mausserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Methanol	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Natriumhydroxidlösung	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Natriumiodid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paranitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
PBS Dulbecco mit Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Pferdeserum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Random Hexamere	GE Healthcare, München, Deutschland
Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA)	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Salpetersäure 65% (ultrarein)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trisbase)	AppliChem, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

**Tab. 2: Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangabe**

### 2.1.3 Zellkulturmedien und -zusätze

<i>Zellkultur-Basismedien:</i>	
DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DMEM/High Glucose mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<i>Zellkulturzusätze:</i>	
Dexamethason (1 mM)	In Ethanol, in Teilproben bei -80°C gelagert
ITS+1 Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat Sesquimagnesiumsalz (50 mg/mL)	In destilliertem Wasser, steril gefiltert, in Teilproben bei -20°C gelagert
Natriumpyruvat (100 mg/mL)	In destilliertem Wasser, steril gefiltert, in Teilproben bei -20°C gelagert
Prolin (40 mg/mL)	In destilliertem Wasser, steril gefiltert, in Teilproben bei -20°C gelagert
<i>Verwendete Zellkulturmedien:</i>	
Chondrogenes Differenzierungsmedium	DMEM/High Glucose (4,5 g/L) 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 50 µg/mL L-Ascorbinsäure-2-Phosphat 1 mM Dexamethason 100 mg/mL Natriumpyruvat 40 ng/mL Prolin ITS+1 Liquid Media Supplement (100x)
Stammzellmedium (SCM)	DMEM/Ham's F-12 mit L-Glutamin 10% fetales Rinderserum (FBS) 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 50 µg/mL L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

Tab. 3: Zellkulturmedien und -additive mit Herstellerangabe

### 2.1.4 Wirtszellen

Zelltyp	Hersteller
Cre8-Zellen	S. Hardy et. al.
Escherichia coli C600	ATCC No. 23724 (American Type Culture Collection); Manassas, VA, USA
HEK-293-Zellen	DSMZ, ATCC No. 305, Braunschweig, Deutschland

Tab. 4: Wirtszellen mit Herstellerangabe

### 2.1.5 Antikörper

Antigen	Vorverdau	Hersteller
Chondroitin-4-Sulfat	Chondroitinase ABC (5 U/mL), Sigma	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kollagen Typ II	Pepsin (1 mg/mL), Sigma	Acris, Hiddenhausen, Deutschland
Kollagen Typ X	0,25% Trypsin, Sigma	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

Tab. 5: Antikörper zur Charakterisierung des Phänotyps der hMSCs

### 2.1.6 Enzyme

BioScript Reverse Transkriptase	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Collagenase NB4	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
MangoTaq DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
2,5% Trypsin (10x konzentriert)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Tab. 6: Enzyme mit Herstellerangabe

### 2.1.7 In adenovirale Vektoren eingebaute Gene

Gensymbol	Sequenz der Gen-Bank	Hersteller/Bezugsquelle
BMP-2	BC03602	C. Evans, Boston RA, USA, Ks 7
IHH	BC034757	ATCC No.
Jellyfish-GFP	X96418	C. Evans, Boston RA, USA, Ks 7
SOX-9	BC007951	C. Evans, Boston RA, USA, Ks 7
TGF-β1	BC001180	C. Evans, Boston RA, USA, Ks 7

Tab. 7: Vektor-cDNA mit Herstellerangabe

### 2.1.8 Primer

Alle verwendeten Primer waren bereits im Wissenschaftlichen Labor des König-Ludwig-Hauses etabliert. Diese wurden, wenn möglich, so hergestellt, dass sie verschiedene Exons überspannen, um falsch positive Nachweise von DNA-Verunreinigungen in den RNA-Proben zu vermeiden.

Gen	Primersequenz (5'-3')	Anneal. Temp. (°C)	Produkt-größe (bp)	Zyklus-zahl
<b>Chondrogene Marker</b>				
Col II	Sense: TTCCCAGGTCAAGATGGTC Antisense: CTTCAGCACCTGTCCACCA	58.0	374	35
Col II (rt)	Sense: AGGAGAGCCTGGAGATGAC Antisense: ATCCTCTCTCACCACGTTGC	60.3	20	
AGN	Sense: TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC Antisense: GGAGGTGGTAATTGCAGGGAACA	54.0	392	30
COMP	Sense: CAGGACGACTTTGATGCAGA Antisense: AAGCTGGAGCTGTCTGGTA	54.0	312	32
FMD	Sense: CTTACCCCTATGGGGTGGAT Antisense: GTACATGGCCGTGAGGAAGT	54.0	389	35
SOX-9	Sense: ATCTGAAGAAGGAGAGCGAG Antisense: TCAGAAGTCTCCAGAGCTTG	58.0	263	35
SOX-9 (rt)	Sense: AGTACCCGCACTTGCACAAC Antisense: CGTTCTTCACCGACTTCCTC	55.0	20	
<b>Hypertrophe und osteogene Marker</b>				
Col X	Sense: CCCTTTTTGCTGCTAGTATCC Antisense: CTGTTGTCCAGTTTTCTGGCAC	54.0	468	25
Col X (rt)	Sense: CCCAACACCAAGACACAGTTC Antisense: GACTTCCGTAGCCTGGTTTTTC	60.5	21	
OP	Sense: ACGCCGACCAAGGAAAATC Antisense: GTCCATAAACCACACTATCACCTCG	51.0	483	35
Col I	Sense: GGACACAATGGATTGCAAGG Antisense: TAACCACTGCTCCACTCTGG	54.0	461	32
OC	Sense: ATGAGAGCCCTCACACTCCTC Antisense: GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	59.0	387	35
ALP	Sense: TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA Antisense: TCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	51.0	454	35
ALP (rt)	Sense: GGAActCCTGACCCTTGACC Antisense: CCACCATCTCGGAGAGTGAC	60.9	20	
<b>Interne Kontrolle</b>				
EF1α	Sense: AGGTGATTATCCTGAACCATCC Antisense: AAAGGTGGATAGTCTGAGAAGC	54.0	234	25

**Tab. 8: Primersequenzen mit Anneal. Temp. (Annealing Temperatur), Produktgröße (bp) und Zykluszahl**

rt: Primerpaare, die ausschließlich für die quantitative Real Time-PCR verwendet wurden.

AGN = Aggrecan core protein (Aggrecan); ALP = Alkalische Phosphatase; Col = Kollagen;

COMP = Cartilage oligomeric matrix protein; EF1α = Elongation factor 1α; FMD = Fibromodulin;

OC = Osteocalcin; OP = Osteopontin; SOX-9 = SRY (sex determining region y) -box-9.

### 2.1.9 Puffer- und andere Lösungen

<i>Lösungen für die Zellkultur:</i>	
1,25 U/mL Collagenase	in PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> steril gefiltert bei -20°C in Teilproben gelagert
1x PBS	9,55 g PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> 1 L destilliertes Wasser pH auf 7,4 eingestellt und autoklaviert
1x PBS/EDTA	9,55 g PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>

	0,2 g EDTA-Tetranatriumsalzhydrat 1 L destilliertes Wasser pH auf 7,4 eingestellt und autoklaviert
0,25% Trypsin	5 mL 2,5% Trypsin (steril) 50 mL 1x PBS
<i>Lösungen für die Molekularbiologie:</i>	
Alkalischer Lysispuffer 1	7,507 g 0,1 M Glycin 1 mL 1% Triton X-100 203 mg 1 mM MgCl <sub>2</sub> 138 mg 1 mM ZnCl <sub>2</sub> 1 L destilliertes Wasser pH auf 9,6 eingestellt
Alkalischer Lysispuffer 2	7,507 g 0,1 M Glycin 203 mg 1 mM MgCl <sub>2</sub> 138 mg 1 mM ZnCl <sub>2</sub> 1 L destilliertes Wasser pH auf 9,6 eingestellt
Paranitrophenylphosphat (PNPP)	20 mg PNPP 1 mL destilliertes Wasser Bei -20°C in Teilproben gelagert
10x TBE	108 g Trisbase 55 g Borsäure 9,05 g EDTA-Tetranatriumsalzhydrat 1 L destilliertes Wasser pH auf 8,3 eingestellt und autoklaviert
<i>Lösungen für die Histologie:</i>	
1% Eosinlösung	1 g Eosin 100 mL destilliertes Wasser 1 Tropfen Essigsäure
Hämalaunlösung	6 g Hämatoxylin 1 g Natriumiodid 250 g Aluminiumkaliumsulfat 250 g Chlorhydrat 5 g Zitronensäure 5 L destilliertes Wasser Vier Wochen offen lagern bis Gebrauch
Kernechtrotlösung	5 g Aluminiumsulfat 0,1 g Kernechtrot Auflösen in 100 mL kochendem, destilliertem Wasser; Abkühlen und Filtrieren
4% Phosphat-gepuffertes Paraformaldehyd	4 g Paraformaldehyd gelöst in 75 mL 1x PBS Nach 5 min bei 55°C Zugabe von Natriumhydroxid bis Lösung aufklart (ca. 100 µL) Bei Zimmertemperatur pH-Einstellung auf 7,4 und Zugabe von 100 mL 1x PBS
<i>Lösungen für die Immunhistochemie:</i>	
Blockierungslösung	1 g BSA 2,5 mL Pferdeserum

	50 mL 1x TBS
1 M Tris-HCl (pH 2,0)	121,14 g Trisbase 1 L destilliertes Wasser mit Salzsäure auf pH 2,0 einstellen
Waschpufferlösung	Vorratslösung: 10x TBS (0,5 M), pH 7,6 60,6 g Trisbase 87,66 g Natriumchlorid 1 L destilliertes Wasser pH-Einstellung auf 7,6; Autoklavieren Arbeitslösung: 1x TBS (0,05 M), pH 7,6 10x TBS wird 1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser Ergänzen mit 0,5% Tween 20

**Tab. 9: Lösungen mit Inhaltsstoffen**

### 2.1.10 Bausätze

Alkaline Phosphatase, Leukocyte Kit No. 86C	Sigma, Deutschland
BioGenex Super Sensitive™ Link-Label iHC Detection System	DCS, Hamburg, Deutschland
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
GAG-Assay-Kit	Biocolor, Carrickfergus County Antrim, UK
KAPA SYBR® FAST qPCR Kit	Kapa Biosystems, USA
Live/Dead Viability stain	Mobitec, Göttingen, Deutschland
Nucleospin® RNA II isolation kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Quant-iT™ DNA Detection Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SIGMA® Apoptosis Detection Kit; Annexin V-CY3	SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA

**Tab. 10: Bausätze mit Herstellerangabe**

### 2.1.11 Geräte

Accu-jet Pipettierer	Brand, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Autoclave H+P Varioclave Dampfsterilisator	Thermo Elektron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
AxioCam MRc Digitalkamera	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator Heraeus B5060	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Electrophorese Stromversorgung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Glasware	Schott, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Heißluftsterilisator Heraeus	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Heizblock	Boekel Scientific, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Kühlschrank Fresh Center	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Laboratorspülmaschine	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Laminar airflow cabinet HERA safe	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland
Magnetrührer und -heizer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Micropipetten	ABIMED Analysentechnik GmbH, Langenfeld, Deutschland
Microtom RM2125RT	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop: Axiovert 25, Axioskop, und Axioskop 2 MOT	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Neubauer Zellzählkammer	Marienfeld Laboratory Glasware, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
pH-Meter Inolab pH level 1	WTW, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Photometer SLT Spectra Classic	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Qubit™ Fluorometer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Thermodrucker	Seico, gekauft bei LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
Thermozykler PTC-200	MJ Research, gekauft bei Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Tiefkühltruhe Bosch Economic (-20°C)	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Tiefkühltruhe IIShin (-80°C)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Wasserbad WB7	Memmert, gekauft bei A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge pico	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Electron GmbH, Oberschleißheim, Deutschland

**Tab. 11: verwendete Geräte mit Herstellerangabe**

## 2.1.12 Software und Onlinedatenquellen

AxioVision 4.4.1.0	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Bio ID/Capt MW Software	LTF, Wasserburg, Deutschland
Bio Profile Software	LTF, Wasserburg, Deutschland
e/ Ensembl Human	<a href="http://www.ensembl.org/Homo_sapiens">http://www.ensembl.org/Homo_sapiens</a>
Magellan 3.00	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
NCBI Blast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
NCBI Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed</a>
Photoshop Elements 4.0	Adobe, gekauft bei der Universität Würzburg, Deutschland

Tab. 12: Software und Onlinedatenquellen

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur und Transduktion

#### 2.2.1.1 Isolierung und Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen

Mit Einwilligung der Ethikkommission der Universität Würzburg wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) aus dem Knochenmark von Hüftköpfen isoliert, die bei einer totalen Hüftarthroplastik von Arthrosepatienten für Forschungszwecke gewonnen wurden. Zur Verwendung kamen fünf Femurköpfe von fünf unterschiedlichen Patienten zwischen 46 und 58 Jahren (Durchschnittsalter: 52 Jahre). Es wurde dabei gemäß dem modifizierten Haynesworth-Protokoll nach Nöth vorgegangen [116-117].

Durch Auskratzen des Hüftkopfes mittels einer scharfen Kürette wurden das Knochenmark sowie die Knochenspongiosa gewonnen und zusammen in Mengen von 5-10 mL in Zentrifugenröhrchen mit einem Volumen von 50 mL gegeben. Nach Auffüllen mit Stammzellmedium (SCM) [Tab. 3] auf ein Volumen von insgesamt 50 mL wurden die Röhrchen per Hand geschüttelt und schließlich bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der danach bestehende Überstand mit der Fettschicht wurde mittels Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Nach erneutem Hinzugeben von 10 mL SCM wurde das Röhrchen zur Trennung der hMSCs von den Knochentrabekeln mit dem Vortexer durchgemischt. Nachdem sich das schwere Knochensediment abgesetzt hatte, wurde die überstehende Zellsuspension auf ein 100 µm-Zellsieb pipettiert und in ein neues 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Erneut wurden 10 mL SCM

in das neue Zentrifugenröhrchen hinzugegeben und der Vorgang noch insgesamt viermal wiederholt, um die restlichen hMSCs herauszulösen. Die so gewonnene Zellsuspension wurde erneut bei 200 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die verbleibende Zellsuspension wurde nun mit SCM auf ein Volumen von insgesamt 50 mL aufgefüllt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Zur Auszählung der vitalen Zellen in der Neubauer Zählkammer wurden nun 50 µL aus der resuspendierten Zellsuspension entnommen und mit 50 µl Trypanblaufärbelösung gemischt. Nur die avitalen Zellen nehmen dabei den Farbstoff auf. Im Anschluss daran wurden ca.  $4 \times 10^6$  vitale Zellen/cm<sup>2</sup> Kulturfläche in 175 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C unter feuchter Atmosphäre (95% Luft, 5% CO<sub>2</sub>) im Inkubator kultiviert. Nach 72 h wurden die nicht-adhärenenten Blutzellen unter Aspiration vorsichtig mit der Pipette entfernt und die adhärenenten hMSCs zweimalig mit PBS gewaschen. Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit SCM bis nach ca. 14 Tagen eine Konfluenz der Zellen in der Kulturflasche von etwa 80% vorlag und die Zellen schließlich „geerntet“ werden konnten. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch fünfminütige Inkubation mit 10 mL PBS/EDTA und anschließende zweiminütige Inkubation mit 5 mL 0,25% Trypsin/EDTA bei 37°C. Im Anschluss daran wurde die gleiche Menge an SCM in die Zellkulturflasche hinzugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren.

#### **2.2.1.2 Herstellung rekombinanter Adenoviren mittels Cre/loxP-Rekombination**

Die von dem Genomabschnitt E1 und E3 befreiten, zum Serotyp 5 gehörenden Adenoviren der ersten Generation, die die cDNA für das humane IHH-Gen [Tab. 7] tragen, wurden nach dem Schema der oben bereits ausführlicher beschriebenen Cre/loxP-Rekombination nach dem System von Hardy et al. hergestellt [118] und als Vektor Ad.IHH bezeichnet. Die komplette kodierende Sequenz des humanen IHH-Gens wurde hierfür mittels Klonierung in λ gt 10-Bakteriophagenvektoren eingefügt und als bakterienfreies Phagenlysate vom Hersteller erworben. Danach erfolgten die Vermehrung der λ gt 10-Vektoren in Escherichia coli-Wirtszellen, die auf LB (Luria Broth)-Agarkulturen gezüchtet wurden, die Plauechloroformierung und deren Resuspendierung in SM-Pufferlösung. Die Gewinnung der 1,4 kbp großen cDNA für IHH erfolgte aus der

isolierten  $\lambda$  gt 10-DNA mittels EcoRI-Verdau nach Standardprotokoll [119]. Die ausgeschnittene IHH-cDNA wurde dann in die Xba/Xho-Schnittstelle in den EcoRI-Abschnitt des pAdlox-Vektors kloniert, dessen weitere Bestandteile ein von loxP-DNA-Abschnitten flankierter „early promoter“ des Zytomegalievirus (CMV) sowie ein Neomycin-Resistenzgen waren [118]. Mit Hilfe des CMV-Promotors erfolgte anschließend nach Co-Transfektion und Vermehrung der pAdlox- und  $\psi$ 5-Vektoren-DNA in 293/Cre8-Zellen die Herstellung rekombinanter, IHH-tragender adenoviraler Vektoren [118]. Nach Vermehrung der Viren in HEK-293-Zellen folgte die Aufreinigung dieser über einen Cäsium-Chlorid (CsCl)-Gradienten, um noch vorhandene, kontaminierende Helferviren auszusondern. Vektoren für die anderen Transgene [TGF- $\beta$ 1, SOX-9, BMP-2 und für das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus dem Jellyfisch] wurden auf gleiche Weise hergestellt und freundlicherweise von Prof. C. H. Evans (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

### **2.2.1.3 Vermehrung und Aufreinigung adenoviraler Vektoren**

Nach vorsichtigem Abnehmen des Kulturmediums von fünf mit HEK-293-Zellen konfluent bewachsenen 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen wurde für jede Kulturflasche eine Gebrauchslösung mit 10 ml DMEM/High Glucose Medium ohne FCS und 10  $\mu$ l Virusstock langsam auf den verbliebenen Zellrasen pipettiert und unter behutsamem Schwenken gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurde die Gebrauchslösung mit einer Pipette abgenommen und 20 mL DMEM/High Glucose mit FCS zu jeder Kulturflasche hinzugegeben. Nach weiteren 72 bis 96 h wurden die infizierten Zellen mit einer Pipette vom Flaschenboden abgespült und anschließend die Zell-Virus-Suspension in 50 mL-Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die gesammelten Zellpellets wurden in 10 mL kaltem PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde das Röhrchen in einem Gemisch aus Trockeneis und 70-prozentigem Ethanol tiefgefroren und im 37°C-Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Dann wurden 3  $\mu$ l Benzonase zum Lysat hinzugegeben und dieses bei 37°C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Das Lysat wurde danach

bei 4°C mit 1200 U/min für 10 min zentrifugiert. Der entstandene, virushaltige Überstand wurde auf einen CsCl-Gradienten aufgetragen, dessen Herstellung zuvor in Polystyrolröhrchen erfolgte. Zuerst wurden hierfür 3 mL einer 1,2 g/mL CsCl-Lösung ins Röhrchen gegeben und anschließend 3 mL einer 1,4 g/mL CsCl-Lösung darunter pipettiert. Die so hergestellte, dreischichtige Lösung wurde daraufhin in einer Ultrazentrifuge mit Ausschwingrotor bei 4°C und 20000 U/min 1 h zentrifugiert. Zwischen den beiden Gradientenschichten bildete sich durch Zentrifugation eine milchig-durchscheinende, transparente Virusbande, unter die mit einer 5 mL-Spritze mit aufgesetzter, rosafarbiger Kanüle eingestochen und die Bande flächig abgesaugt wurde. Die geerntete Virusmenge wurde dann im Verhältnis 1:3 mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) verdünnt, erneut auf einen CsCl-Gradienten aufgetragen und das Procedere zur weiteren Aufreinigung zweimalig wiederholt. Schließlich wurde die im letzten Zentrifugationsschritt gewonnene, konzentrierte Virusbande in einen Dialyseschlauch (MW 50000) gegeben und dreimal hintereinander für jeweils 6 h bei 4°C in 500 mL vorgekühltem Dialysepuffer [10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4% (w/v) Sucrose] dialysiert. Anschließend wurde das rekombinante Virus-Dialysat in sterilen Tubes aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.1.4 Titerbestimmung adenoviraler Vektoren**

Zur Vektortiterbestimmung wurde sich das Prinzip der Optischen Dichte (OD) zunutze gemacht: Dabei entspricht eine OD bei einer Wellenlänge (E) von 260 nm einer Virusmenge von  $1 \times 10^{12}$  Viruspartikeln/mL. Hierfür wurden in eine Photometerküvette 5 µl des aufgereinigten Virus und 95 µl HPLC-Wasser pipettiert und im Photometer die Extinktion, mit HPLC-Wasser als Leerwert, gemessen. Geht man davon aus, dass nur ca. 1% der Viruspartikel infektiös sind, ergibt sich für die Anzahl der infektiösen Viruspartikel (IVP) folgende Formel:

$$\text{IVP} = 20 \times E_{260\text{nm}} / 100$$
$$\text{OD1} = 1 \times 10^{12} \text{ Viruspartikel/mL}$$

### **2.2.1.5 Infektion der humanen mesenchymalen Stammzellen mit adenoviralen Vektoren**

Vor der Infektion der hMSCs erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Das Medium wurde hierfür aus jeder Zellkulturflasche abgesaugt und 10 mL PBS zum Waschen der Zellen hinzugegeben. Anschließend wurden 5 mL 0,25% Trypsin langsam auf den Zellrasen pipettiert und die Zellkulturflasche für 10 min im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte zur Resuspendierung der Zellen und Inaktivierung des Trypsins die Zugabe von 10 mL SCM. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und alle Zellpellets zusammen in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10-20 mL SCM resuspendiert. Nach Auflösung des Pellets wurden aus der gut durchmischten Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer 50 µl entnommen und mit 50 µl Trypanblaufärbelösung gemischt. Es wurden alle vitalen, nicht-angefärbten Zellen in den vier Außenquadranten der Zählkammer gezählt. Schließlich wurde ein Mittelwert aus den vier Werten gebildet und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\mathbf{N = 2 \times Z \times P \times 10000}$$

mit N = absolute Zellzahl/Flasche, Z = gezählte Zellen, P = Probenmenge zum Resuspendieren in mL

Das Zellpellet wurde mit der entsprechenden Menge an SCM resuspendiert, so dass dieses erneut auf die ursprüngliche Anzahl der Zellkulturflaschen aufgeteilt werden konnte. Nach der Aussaat der Zellen erfolgte am nächsten Tag die Infektion.

Zur Berechnung der benötigten Virusmenge für die Infektion der hMSCs, bei festgesetztem MOI (Multiplicity of infection)-Wert von 50, gilt folgende Formel:

$$\mathbf{VM = N \times F \times 50 / IVP}$$

mit VM = Virusmenge, N = absolute Zellzahl/Flasche, F = Flaschenanzahl, IVP = infektiöse Viruspartikel/µl

Im Folgenden wurde eine Gebrauchslösung für die Infektion hergestellt, indem zur Virusmenge 4 mL DMEM/High Glucose Medium, 1% Pen-Strep enthaltend, in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen gegeben wurden, damit für jede

Zellkulturflasche im Anschluss eine Infektionslösung von 4 mL vorhanden war. Nach Absaugen des Mediums aus den Zellkulturflaschen wurden diese mit 4 mL Infektionsgebrauchslösung langsam beimpft. Durch vorsichtiges Schwenken der Kulturflaschen wurde die Infektionslösung gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach 2-3 h wurde die Infektionslösung abpipettiert und 20 mL SCM zu jeder Zellkulturflasche hinzugegeben. Für weitere 24 h wurden die Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für jede Infektion wurden ebenfalls Kontrollen mit nicht-infizierten und GFP-transduzierten MSCs durchgeführt.

#### **2.2.1.6 Pelletherstellung und Kultur**

Nach 24 h erfolgte die Weiterverarbeitung der inkubierten, infizierten Zellen. Nach Absaugen des Mediums wurden die nicht-infizierte Negativkontrolle sowie die transduzierten MSCs mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend für 7 min mit 5 mL 0,25% Trypsin im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden zur Inaktivierung des Trypsins 10 mL SCM zu jeder Zellkulturflasche hinzugegeben. Die Suspensionen wurden dann in sterile 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und diese bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Der aus Medium und Trypsin bestehende Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Zellpellet auf dem Grund des Zentrifugenröhrchens so mit chondrogenem Medium resuspendiert, dass im Weiteren 500 µl Medium für ein Zellpellet, bestehend aus ca. 300000 Zellen, in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt werden konnten. Schließlich erfolgte die Zentrifugation der 15 mL-Zentrifugenröhrchen mit 1200 U/min für 10 min. Im Anschluss daran wurde der Deckel der Röhrchen so aufgedreht, dass er nahezu lose auf den Röhrchen auflag, um einen freien Gasaustausch zwischen Röhrchen und Umgebung zu ermöglichen. Die sich nun bildenden Pellets wurden dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator für 21 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Pellets für die weitergehende Diagnostik aus dem Pelletbestand genommen.

## **2.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen**

### **2.2.2.1 Transgenexpression (IHH-, TGF- $\beta$ 1-, BMP-2-ELISA)**

Zur quantitativen Bestimmung von rekombinantem IHH-, TGF- $\beta$ 1- und BMP-2-Protein im Probenüberstand, 24 h nach Mediumwechsel, wurde ein „Enzyme-linked-immunosorbent-assay“ (ELISA) eingesetzt, der sich zum einen die spezifische Interaktion zwischen Antigen und Antikörper, zum anderen die Darstellung der Antigen-Antikörper-Komplexe über eine enzymvermittelte Farbreaktion zunutze macht. Hierfür liegen monoklonale Antikörper, die eine Bindung mit den oben genannten rekombinanten Proteinen eingehen können, immobilisiert auf einer beschichteten Microtiterplatte vor. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wird das Antigen hinzugegeben, das mit den immobilisierten Antikörpern eine Bindung eingeht. In einem zweiten Schritt wird, nach Inkubation der Platte mit der Probe, ein gegen das jeweilige Antigen gerichteter Antikörper dazu pipettiert, der selbst mit einem Enzym gekoppelt ist. Nachdem alle ungebundenen Antikörper entfernt wurden, wird ein Substrat zu den inkubierten Proben hinzugefügt, welches durch das Enzym des zweiten Antikörpers in einen Farbstoff umgewandelt wird, wenn eine spezifische Bindung des enzymgekoppelten Antikörpers mit dem jeweiligen Antigen stattgefunden hat. Für die jeweiligen proteinspezifischen ELISA-Verfahren wurden die Herstellerangaben berücksichtigt. In jedes Well wurden 100  $\mu$ l Verdünnungsreagenz und je 50  $\mu$ l der Standardverdünnungsreihe und der Proben aus den Überständen pipettiert. Im Anschluss wurden die Wells für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Danach erfolgte die Entfernung der Probenreste durch mehrere Waschschrte mit Waschpuffer. Nach Zugabe der entsprechenden Proteinkonjugate wurden die Wells erneut für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert, damit eine spezifische Bindung aller Proteine mit den enzymgekoppelten Antikörpern stattfinden konnte. Es folgten wiederum mehrere Waschschrte. Nun wurden zu jedem Well 200  $\mu$ l Substratlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation der Wellplatten für 30 min bei Dunkelheit wurde die Reaktion mit Stopplösung unterbunden und die Menge des Farbumschlages der einzelnen Wells spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### **2.2.2.2 Quantitative DNA-Bestimmung**

Zur Quantifizierung der DNA-Mengen wurde ein Assay von Invitrogen verwendet. Zuerst wurden die einzelnen Pellets dreimalig in 1 mL PBS gewaschen. Im Anschluss wurde jedes Pellet einzeln in ein Eppendorfggefäß überführt. Zu jedem Pellet wurden dann 200 µl der Papain-Verdauungslösung, bestehend aus 200 µl Papainpuffer und 2 µl Papain, hinzugefügt. Es erfolgte der Verdau der Pellets über Nacht bei 60°C im Heizblock. Vor der Weiterverarbeitung der verdauten Pellets am nächsten Tag musste erst das Qubit™-Fluorometer durch Messung zweier Standardlösungen kalibriert werden. Danach wurden die Standard- und Probenlösungen wie folgt hergestellt: 199 µl der Quant-iT™-Pufferlösung wurden mit 1 µL des Quant-iT™-Reagenz zu einer Arbeitslösung gemischt. Als Nächstes wurden 190 µl der Arbeitslösung zu jeweils 10 µl der Standard- bzw. Probenlösung pipettiert. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur folgten die Messung und Berechnung der DNA-Mengen der einzelnen Proben durch das zuvor kalibrierte Fluorometer.

### **2.2.2.3 Quantitative Glykosaminoglykan-Bestimmung**

Als ein Maß für die chondrogene Differenzierung wurde der Glykosaminoglykan (GAG)-Gehalt der Pellets nach 3, 7, 14 und 21 Kultivierungstagen mithilfe eines GAG-Assays (Blyscan Assay) bestimmt. GAGs stellen einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix chondrogen differenzierter Zellen dar und eignen sich daher gut als ein Parameter zur Beurteilung des chondrogenen Charakters und der Synthesekapazität der chondrogen differenzierten hMSCs. Gemäß dem Versuchsprotokoll des Herstellers erfolgte zuerst der Pelletverdau über Nacht in 200 µl Papainsuspension bei 60°C im Heizblock. Im Anschluss wurden sowohl die Proben als auch die Standardverdünnungsreihe mit Papain-Verdauungspuffer auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 mL Blyscan Dye Reagent wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße für 30 min bei Raumtemperatur gelagert und unter mehrmaligem Vortexen durchmischt. Die Reaktionsgefäße wurden dann zentrifugiert und der sich dadurch bildende Überstand verworfen. Im Anschluss daran wurde das Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes mit 1 mL Blyscan Dissociation Reagent unter Vortexen aufgelöst. Schließlich erfolgte die Quantifizierung der GAG-Mengen in den

einzelnen Proben in einem Spektrometer bei 655 nm, indem die gemessenen Extinktionswerte in ein mit Kalibrierungsproben erstelltes Diagramm übertragen und die korrespondierenden GAG-Mengenwerte abgelesen werden konnten.

#### **2.2.2.4 Quantitative Adenosintriphosphat-Bestimmung**

Zur Bestimmung der Vitalität und Proliferationsraten der Negativkontrolle sowie der transduzierten, kultivierten hMSCs wurde der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay von Promega verwendet. Die in einer Luziferasereaktion gemessene Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration in einem Pellet korreliert dabei mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Zuerst wurden die Pellets hierfür in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 200 µl des CellTiter-Glo® Reagenz in die Gefäße dazu pipettiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Vortexen der Reaktionsgefäße und das Zerkleinern der Pellets mithilfe eines Stößels. Nach zehnmütiger Inkubation der Zellen und Schütteln der Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur wurden 200 µl der vollständig lysierten Pellets auf eine 96-well-Platte übertragen und das Lumineszenzsignal im Luminometer gemessen.

#### **2.2.2.5 Quantitative Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase**

Die Alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität der chondrogen differenzierten Zellen wurde densitometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm durch einen Farbumschlag bei der Umwandlung von p-Nitrophenolphosphat in p-Nitrophenol und organisches Phosphat gemessen [120]. Zunächst wurden die Pellets hierfür in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, das Kultivierungsmedium abgesaugt und 500 µl PBS zum Waschen der Pellets hinzugefügt. Nach Absaugen des PBS wurden in die Reaktionsgefäße 200 µl alkalischer Lysispuffer 1 pipettiert und zugleich unter Zuhilfenahme eines Stößels die Pellets zerkleinert. Im Anschluss wurden die Gefäße für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt, um eine vollständige Lyse der Pellets zu erreichen. Danach wurden zum Lysat 200 µl einer Arbeitslösung, die durch alkalischen Lysispuffer 2 und Paranitrophenylphosphat (Substrat der ALP) in einem Verhältnis von 10:1 hergestellt worden war, hinzugefügt. Nach Eintreten

des Farbumschlages wurden nach 10 min 200 µl des Lysats mittels einer Pipette auf eine 96-well-Platte übertragen und der Farbumschlag photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Schließlich erfolgte die Quantifizierung der ALP-Aktivität durch Berechnung mittels einer ebenso gemessenen Verdünnungsreihe sowie die Normierung auf den jeweiligen korrespondierenden DNA-Gehalt des Pellets.

## 2.2.3 Histologische Untersuchungen

### 2.2.3.1 Fixierung und Paraffineinbettung

Nach Entfernung des Mediums durch Absaugen wurde das Pellet zweimalig mit jeweils 3 mL PBS gewaschen und danach für 2 h in 3 mL 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss daran wurde die Fixierlösung 2 h in Leitungswasser ausgewaschen. Zur Entwässerung des Pellets wurde dieses über Nacht in 50% Ethanol (EtOH) gelagert. Die Paraffineinbettung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1 h	in 70% EtOH dehydrieren
1 h	in 80% EtOH dehydrieren
1 h	in 90% EtOH dehydrieren
1 h	in 100% EtOH dehydrieren
30 min	mit EtOH/Amylacetat (1:1) bei Raumtemperatur inkubieren
30 min	mit EtOH/Amylacetat (1:1) bei 60°C inkubieren
2 x 30 min	mit Amylacetat bei ca. 60°C inkubieren
	in Paraffin I über Nacht in den Wärmeschrank stellen
	in Paraffin II über Nacht in den Wärmeschrank stellen

Nach Paraffinierung des Pellets wurde dieses in eine auf einer Heizplatte angewärmte Edeltstahlgießform, in die Paraffin II eingegossen war, überführt. Danach wurde eine Einbettkassette der Gießform aufgelegt und der Paraffinblock erst bei Raumtemperatur, dann im Kühlschrank zur Aushärtung gebracht. Nach der Aushärtung wurde die Edeltstahlgießform entfernt und der Paraffinblock bei -20°C eingefroren.

### 2.2.3.2 Herstellung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

Der Paraffinblock wurde aus dem Gefrierschrank direkt in die Schneidemaschine eingespannt und mit einer Schnittdicke von ca. 30-40 µm angeschnitten. Sobald das Pellet von dem Messer erfasst wurde, wurde die Schnittdicke auf 3-4 µm umgestellt. Die Schnitte wurden dann zum Strecken vorsichtig in ein erwärmtes Wasserbad überführt und von dort wurden 3-4 Schnitte auf einen einfachen Objektträger gezogen, die über Nacht getrocknet wurden.

Die Entparaffinierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

60 min	Wärmeschrank bei 60°C zum Schmelzen des Paraffins
8 min	Entparaffinieren mit Xylol I
8 min	Entparaffinieren mit Xylol II
2 x 2 min	95% EtOH
5 min	70% EtOH
5 min	50% EtOH
	H <sub>2</sub> O dest.

### 2.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mittels dieser allgemeinen Färbung werden Gewebestrukturen sowie die darin enthaltenen Zellen dargestellt. Dabei werden alle basophilen Gewebe- und Zellstrukturen, wie z. B. das Chromatin der Zellkerne und einige Zytoplasmabestandteile, durch Hämatoxylin blau angefärbt, wohingegen azidophile Bestandteile durch Eosin rot angefärbt werden.

Die entparaffinierten Pellets wurden zur Färbung wie folgt weiterbehandelt:

9 min	Färben in Hämatoxylinlösung
	Spülen mit H <sub>2</sub> O dest.
13 s	Differenzieren in 0,25% HCl/50% EtOH
	Spülen mit H <sub>2</sub> O dest.
10 min	Bläuen in Leitungswasser
1-2 min	Färben in 1% Eosinlösung
	Spülen mit H <sub>2</sub> O dest.
3 s	Differenzieren in 70% EtOH
3 s	Entwässern in 95% EtOH
2 x 5 min	100% Isopropanol
2 x 5 min	Xylol
	Eindecken mit organischem Eindeckmittel

#### 2.2.3.4 Alcian Blau-Färbung

Diese Färbung dient dem Nachweis negativ geladener, sulfatierter Proteoglykane sowie der damit verbundenen chondrogenen Differenzierung der kultivierten Pellets.

Es wurde nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen:

3 min	Behandlung mit 3% Essigsäure
30 min	Färben in 1% Alcian Blau 8 GX (pH 1,0)
	Spülen mit H <sub>2</sub> O dest.
2 min	Gegenfärbung mit Kernechtrot
	Spülen mit H <sub>2</sub> O dest.
3 s	Differenzieren in 70% EtOH
3 s	Entwässern in 95% EtOH
2 x 5 min	100% Isopropanol
2 x 5 min	Xylol
	Eindecken mit organischem Eindeckmittel

#### 2.2.3.5 Alkalische Phosphatase-Färbung

Nach Entparaffinierung der Pelletschnitte wurde die ALP in den Pellets mithilfe des Alkaline Phosphatase Detection Kit von Sigma® [Tab. 10] zur Beurteilung des Maßes für eine hypertrophe bzw. osteogene Differenzierung der transduzierten hMSCs blau angefärbt. Es wurde hierfür nach Herstellerangaben wie folgt vorgegangen:

Zuerst wurde die Diazoniumsalzlösung aus jeweils 100 µl FBB-Alkaline- und Natrium-Nitrit-Lösung hergestellt und dann mit 4,5 mL destilliertem Wasser gemischt. Diese Lösung wurde im Anschluss mit 100 µL Naphthol AS-BI Alkali-Lösung vermengt, womit schließlich die dreimalig mit destilliertem Wasser gewaschenen Pelletschnitte gefärbt wurden. Es folgte eine 15-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur, in der sich bei Vorhandensein der ALP die ALP-positiven Areale im Zellpellet blau verfärbten. Nach Abspülen der Färbelösung wurden die gefärbten Pelletschnitte luftgetrocknet und schließlich in wässrigem Eindeckmittel (Aquatex) eingedeckt.

### 2.2.3.6 Immunhistochemische Färbungen

Zum Nachweis von chondrogenen und osteogenen Differenzierungsmerkmalen der transduzierten hMSCs wurden oberflächentypische Antigene der differenzierten Zellen immunhistochemisch angefärbt und dargestellt. Die spezifischen Antigene, die verwendeten Antikörper sowie die jeweiligen Konzentrationen sind der Tab. 5 zu entnehmen.

Es wurde nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen:

15 min	Rehydrieren der Zellen mit Waschpuffer
	Markieren der Schnitte mit DarkoPen
15 min	Verdau mit 1 mg/mL Pepsin in 1 M Tris-HCl, pH 2,0, bei RT
	Dreimal Waschen mit Waschpuffer
10 min	Spezifische Vorbehandlung zur optimalen Antikörperbindung
	Dreimal Waschen mit Waschpuffer
20 min	Blockieren unspezifischer Bindungsstellen in 100 µL Blockierungslösung bei RT
ü. Nacht	Überschichten der Zellen mit 100 µL primärem Ak (1:300)

Der Färbung liegt das Prinzip der Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode zugrunde. Sie wird in drei großen Schritten durchgeführt: Als Negativkontrolle wurde in Mausserum die Proteinkonzentration mit der Blockierungslösung an die des Primärantikörpers angeglichen und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte mittels des Detektionssystems (Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) die Darstellung der Immunreaktivität. Als sekundärer Antikörper

fungierte der Link-Antikörper, der biotinyliert ist und mit dem Label ALP-Enzym-Konjugat, bestehend aus der ALP und dem an sie gekoppelten Streptavidin, reagierte. Die Farbreaktion wurde schließlich mithilfe des chromogenen Substrates der ALP (Fast Red Chromogen) vollzogen und sichtbar gemacht.

Es wurde nach Hersteller-Protokoll vorgegangen:

	Dreimal Waschen mit Waschpuffer
20 min	Überschichten der Zellen mit drei Tropfen Link in feuchter Kammer bei RT
	Dreimal Waschen mit Waschpuffer
20 min	Überschichten der Zellen mit drei Tropfen Label in feuchter Kammer bei RT
	Dreimal Waschen mit Waschpuffer
5-30 min	Chromogen Fast Red hinzugeben und Rotfärbung beachten
	Dreimal Waschen mit H <sub>2</sub> O dest.
1 min	In H <sub>2</sub> O dest. belassen
9 min	Gegenfärbung mit Hämatoxylin
	Dreimal Waschen mit H <sub>2</sub> O dest.
	Bläuen mit Leitungswasser
	Eindecken mit wässrigem Eindeckmittel (Aquatex)

#### **2.2.3.6.1 Kollagen Typ II-Färbung**

Die Spezifität dieses monoklonalen Antikörpers richtet sich gegen die  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 3-Ketten des Kollagen Typ II in Knorpelgewebe oder chondrogen differenzierten MSCs. Zur Färbung wurde das oben beschriebene Dako REAL Detection System (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) verwendet [2.2.3.6].

#### **2.2.3.6.2 Kollagen Typ X-Färbung**

Zur Färbung kam das oben beschriebene Dako REAL Detection System (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) zur Anwendung [2.2.3.6].

### **2.2.3.6.3 Chondroitin-4-Sulfat-Färbung**

Zur Färbung wurde das oben beschriebene Dako REAL Detection System (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) verwendet [2.2.3.6].

### **2.2.3.7 Zweifach-Fluoreszenzfärbung Annexin V-Cy3/6-CFDA**

Die Gruppe der Annexine besteht aus verschiedenen Proteinen, die Phospholipide in der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden können. Die Unterscheidung zwischen apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen beruht auf folgendem Prinzip: Im Zuge des Einsetzens des Apoptosevorgangs wird Phosphatidylserin zum Teil auch an die Außenseite der Zellmembran transportiert. Dort kann Annexin-Cy3 (AnnCy3) an das ausgeschleuste Phosphatidylserin-Molekül unter Vorhandensein von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden. Daher erscheinen apoptotische Zellen fluoreszenzmikroskopisch rot. Vitale Zellen hingegen werden im Fluoreszenzmikroskop grün dargestellt, da in lebendigen Zellen vorhandene Esterasen die nicht-fluoreszierende Form 6-Carboxyfluorescein-Diacetat (6-CFDA) zur fluoreszierenden Form 6-Carboxyfluorescein (6-CF) umwandeln können. So stellen sich apoptotische Zellen fluoreszenzmikroskopisch nur rot dar, vitale Zellen hingegen ausschließlich grün und Zellen in der frühen Apoptose rot und grün.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Pellets zuerst zweimalig mit 1 mL PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Pellets dreimalig mit 200  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer geblottet und schließlich mit 300  $\mu\text{l}$  Färbelösung, bestehend aus AnnCy3, 6-CFDA, 10x-Bindungspuffer und deionisiertem Wasser, gefärbt und hierfür durch Aluminiumfolie lichtgeschützt für 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Nun wurden die Pellets erneut mit 200  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer gewaschen und danach fixiert.

## **2.2.4 Genexpressionsanalyse**

### **2.2.4.1 RNA-Isolation**

An den Tagen 3, 7, 14 und 21 der Zellkultivierung der hMSCs wurden aus jeder IHH-Transduktionsgruppe sowie aus der Negativkontrolle jeweils fünf Pellets zur Genexpressionsanalyse aus dem Bestand genommen. Diese fünf Pellets

wurden mithilfe einer Mikropistille zerkleinert und durch Zugabe von 350 µl einer Pufferlösung, bestehend aus 1 mL RA1-Lysispufferlösung und 10 µl β-Mercaptoethanol, durch mehrmaliges Vortexen und Durchmischen mit einer Pipette lysiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem Nucleospin<sup>®</sup> RNA II isolation kit (Machery-Nagel). Zuerst wurde das Lysat hierfür in ein mit einem Filter ausgestattetes Eppendorf-Zentrifugengefäß pipettiert und 1 min bei 11000 x g abzentrifugiert. Danach wurde die Filtereinheit verworfen und 350 µl von 70%-Ethanol hinzugefügt und das Eppendorfgefäß auf dem Vortexer durchmischt. Das Filtrat wurde dann über eine Silicamembran 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Lysispuffer sorgte dabei für eine optimale Bindung der RNA an die Silicamembran. Für einen effektiveren DNase-Verdau wurden zudem 350 µl Membrane desalting buffer (MDB) hinzugegeben und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Im Anschluss folgten der DNase-Verdau und das Waschen mit verschiedenen Pufferlösungen sowie das Trocknen der Silicamembran. Die vor allem von DNA-Verunreinigungen, Salzen und makromolekularen Zellbestandteilen befreite Membran wurde schließlich in ein Nuklease-freies Eppendorfgefäß gegeben: Zur Lösung der in der Filtereinheit der Silicamembran befindlichen RNA wurde RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und das Eppendorfgefäß mit der Säule 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Nun erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Verunreinigungen, wie Kohlenhydrate oder Peptide, absorbieren bei einer Wellenlänge von 230 nm und Proteine bei 280 nm. Die Überprüfung der Reinheit der DNA wurde daher über zwei Quotienten,  $E_{260/280}$  bzw.  $E_{260/230}$ , durchgeführt. Die gemessenen Werte für  $E_{260/280}$  sollten dabei zwischen 1,8 und 2,0 bzw. die für  $E_{260/230}$  größer als 2,0 liegen. Ein deutlich kleineres  $E_{260/280}$ -Verhältnis zeigte dabei mögliche Proteinkontaminationen an, ein deutlich größeres die Anwesenheit von degradiertem RNA. Die isolierte, aufgereinigte RNA wurde schließlich bei -80°C für die folgende Weiterverarbeitung gelagert.

#### **2.2.4.2 cDNA-Synthese**

Zu Beginn wurden das für die cDNA-Synthese benötigte Volumen an RNA-Suspension ausgerechnet, die RNA-Proben auf Eis aufgetaut und das Volumen

der RNA-Suspension mit autoklaviertem HPLC-H<sub>2</sub>O in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf ein Endvolumen von 11 µl aufgefüllt. Danach erfolgte die Zugabe von je 1 µl Random Hexamere für jede Probe, durch deren Erhitzen bei 70°C und anschließendes Abkühlen auf Eis die enthaltene DNA denaturiert wurde und die Random Hexamere angelagert werden konnten. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden jeder Probe 8 µl Master Mix, der aus 4 µl 5x-Reaction buffer, 1 µl 10 mM dNTPs, 2,75 µl HPLC-H<sub>2</sub>O und 0,25 µl 200 U/µL Reverse Transkriptase bestand, hinzugegeben. Die Proben wurden zuerst 10 min bei Raumtemperatur und dann 60 min bei 42°C im Heizblock inkubiert. Es erfolgte durch Elongation die Bildung von cDNA-Einzelsträngen. Die Synthese-Reaktion wurde durch Erhitzen der Proben auf 70°C beendet. Das Volumen jeder Probe wurde schließlich durch Zugabe von 30 µl HPLC-H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht und die synthetisierte cDNA bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.3 Semiquantitative RT-PCR**

Die hergestellte cDNA wurde mittels der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) unter der Verwendung der MangoTaq-Polymerase und der in Tab. 8 aufgeführten, humanspezifischen Primerpaare vervielfacht. Als erster Schritt wurde hierfür für jedes Primerpaar ein Mastermix ohne cDNA für jede cDNA-Probe und für eine PCR-Negativkontrolle (HPLC-H<sub>2</sub>O) angesetzt. Der Mastermix für eine cDNA-Probe bestand aus 21,9 µL HPLC-H<sub>2</sub>O, 3 µL 10x-Puffer, jeweils 1 µL dNTPs (10 mM), Primer forward und reverse (5 pmol/µl), MgCl<sub>2</sub> (50 mM) sowie 0,1 µL MangoTaq-Polymerase (5000 U/mL). Der Mastermix-Ansatz wurde mit 1 µl cDNA gemischt und in ein PCR-Tube pipettiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der PCR-Tubes im Thermocycler, der nach speziellen Programmen für die jeweiligen Primer die Proben behandeln konnte:

Schritt 1: initiale Denaturierung:	94°C	3 min
Schritt 2: Denaturierung:	94°C	30 s
Schritt 3: Bindung:	51-58°C	45 s (je nach Primer)
Schritt 4: Elongation:	72°C	1 min
Schritt 5: letzte Elongation:	72°C	5 min
Schritt 6: Kühlen:	12°C	durchgehend

Die Schritte 2 bis 4 wurden bis zu 35-mal durchlaufen, abhängig von der Bandenintensität des PCR-Produktes in der Gelelektrophorese. Die in den PCR-Durchläufen verwendeten Bindungstemperaturen (Annealing Temperaturen) in Schritt 3 sind in Tab. 8 für die jeweiligen Primer angegeben.

#### **2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte kam ein 2%-Agarosegel, das Ethidiumbromid enthielt, zum Einsatz. Die aufgetrennten Banden wurden mittels der Bio Profile Software abgelichtet. Als Erstes musste hierfür das Agarosegel wie folgt hergestellt werden: 1,5 g Agarosepulver wurden mit 100 mL 0,5x-TBE-Puffer vermischt und in der Mikrowelle erhitzt bis das Pulver komplett im Puffer gelöst war. Nach einer kurzen Abkühlphase der Gellösung wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und dieses durch langsames Schwenken gleichmäßig in der Lösung verteilt. Danach wurde das Gel in eine Gelgießvorrichtung gegossen und die benötigten Kämme eingesetzt. Anschließend wurde das nach ca. 30 min ausgehärtete Gel mit 0,5x-TBE-Puffer als Laufpuffer bedeckt und gleiche Mengen an PCR-Produkt in die Taschen des Agarose-Ethidiumbromidgels pipettiert. Zusätzlich wurden noch 5 µl einer 100 bp-DNA-Leiter, als Marker zur Einschätzung der Molekülgröße der PCR-Produkte, auf das Gel aufgetragen und dieses anschließend bei ca. 145 V für ca. 45 min aufgetrennt. Schließlich erfolgten die Aufnahme des Gels unter UV-Licht sowie dessen densitometrische Auswertung mit Hilfe der Bio ID/Capt MW Software (LTF, Wasserburg). Auf diese Weise wurde eine semiquantitative Analyse der für bestimmte Gene vorhandenen RNA-Menge in einzelnen, unterschiedlich transduzierten Pelletgruppen des Versuchsansatzes durchgeführt.

#### 2.2.4.5 Quantitative RT-PCR

Bei der Vervielfältigung der cDNA bzw. der gesuchten Gensequenzen kamen die in Tab. 8 aufgeführten, humangenomspezifischen Primer sowie das KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (Biosystems) zum Einsatz. Der im KAPA Mastermix bereits vorhandene, mit der DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green ermöglicht über Extinktionsmessungen im DNA Engine Opticon™ System eine Quantifizierung der vervielfältigten PCR-Produkte nach jedem Zyklus. Zu den 10 µl aus dem bereits vorgefertigten, SYBR-Green I und DNA-Polymerase enthaltenden Mastermix wurden hierfür im Reaktionsansatz 7 µl autoklaviertes HPLC-H<sub>2</sub>O, je 1 µl Primer forward und reverse (5 pmol/µl) sowie 1 µl der jeweiligen, 1:5-verdünnten cDNA in lichtundurchlässige PCR-Tubes dazu pipettiert. Die PCR-Tubes wurden anschließend gevortext, zentrifugiert und schließlich in das DNA Engine Opticon™ System eingesetzt. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) lief nach folgendem Programm ab:

Schritt 1: initiale Denaturierung:	95°C	3 min
Schritt 2: Denaturierung:	95°C	30 s
Schritt 3: Bindung:	51-58°C	20 s (je nach Primer)
Schritt 4: Elongation:	72°C	30 s
Schritt 5: letzte Elongation:	72°C	7 min
Schritt 6: Erstellen der Schmelzkurve von 55°C bis 95,1°C, Ablesen alle 0,3°C für 1 s		

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten nach der ersten Elongationsphase (Schritt 4) sowie nach jedem Wiederholungszyklus der Schritte 2 bis 4. Sowohl die Zykluszahl als auch die entsprechenden Bindungstemperaturen waren spezifisch für das jeweilige Genprodukt und sind der Tab. 8 zu entnehmen. Durch Bindung des fluoreszierenden Farbstoffes an das Genprodukt konnte der Schwellenzyklus (C<sub>T</sub>-Wert) bestimmt werden, der den Beginn der exponentiellen Vervielfältigung des Genproduktes markiert. Im Anschluss erfolgten die Normierung der gemessenen mRNA-Mengen auf die interne Kontrolle EF1 $\alpha$  sowie deren Berechnung, indem ein relatives Verhältnis zu der mRNA-Expression der nicht-infizierten oder GFP-transduzierten hMSCs

angegeben wurde. Insgesamt wurden auf diese Weise drei PCR-Läufe für jedes Gen aus drei verschiedenen Hüftkopfsponden durchgeführt.

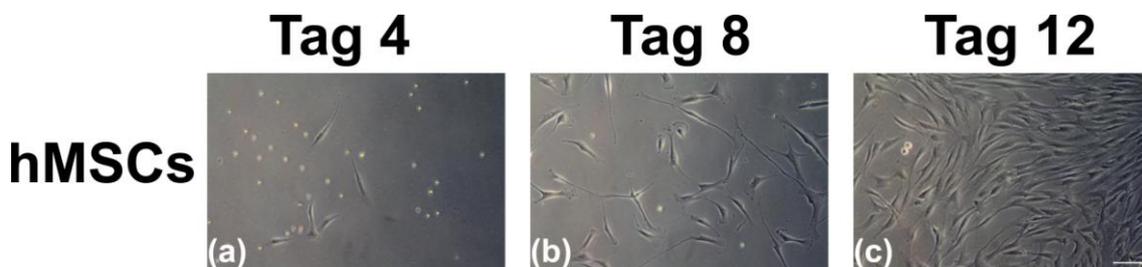
### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Zu sämtlichen numerischen Daten, die aus den ELISAs zur Transgenexpression, den ALP-, ATP-, GAG- und DNA-Assays sowie aus den semiquantitativen und quantitativen PCR-Analysen gewonnen wurden, wurden der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt ( $n = 3$ ). Es wurden insgesamt Knochenmarkpräparate von fünf verschiedenen Patienten ( $m = 5$ ), zwischen 46 und 58 Jahren (Durchschnittsalter 52), verarbeitet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Morphologie und Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen in Monolayer und Pelletkultur

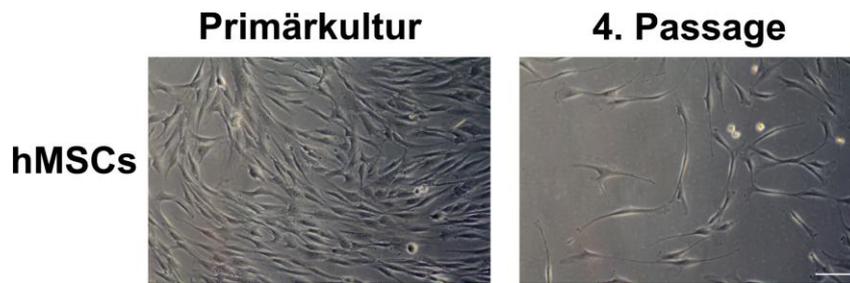
Die im Stammzellmedium kultivierten, undifferenzierten hMSCs der Primärkulturen wiesen im Zuge der Kultivierung eine für MSCs typische Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf. Nach etwa 4 Tagen waren mikroskopisch einzelne adhärente, spindelförmige Fibroblasten neben eher runden, nicht-adhären Zellen nachweisbar. In den folgenden Tagen war eine starke Vermehrung der adhären Zellen sichtbar bis nach etwa 12 Tagen ein dichter Zellrasen, bestehend aus konfluenten hMSCs, entstanden war.



**Abb. 2: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von hMSC-Primärkulturen in Monolayer**

Dargestellt ist die Vermehrung der hMSCs mit Fibroblasten-ähnlicher Morphologie von Tag 4 (a) über Tag 8 (b) bis zu Tag 14 (c) in der Primärkultur auf Zellkultur-Polystyrene. Originalvergrößerung: 50-fach. Skalierungsbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

Nachdem die Zelldichte einer Konfluenzrate von ca. 70-80% entsprach, wurden die kultivierten Zellen in eine neue Zellkulturflasche in einer Dichte von  $2,3 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die passagierten Zellen zeigten dabei zum größten Teil die bekannte Fibroblasten-ähnliche Morphologie der Primärkulturen. Allerdings nahmen mit steigender Passagezahl die Wachstumsrate und das Differenzierungspotential der kultivierten Zellen ab. Aus diesem Grund wurden für alle Versuche in dieser Arbeit entweder Primärkulturen oder Zellen aus erster Passage verwendet. Die hMSCs aus den Primärkulturen bzw. aus erster Passage wurden bei einer Konfluenzrate von ca. 70-80% mit verschiedenen adenoviralen Vektoren transduziert sowie ein Teil als Negativkontrolle nicht infiziert, zu Pellets verarbeitet und über 21 Tage als Pelletkultur mit regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert.

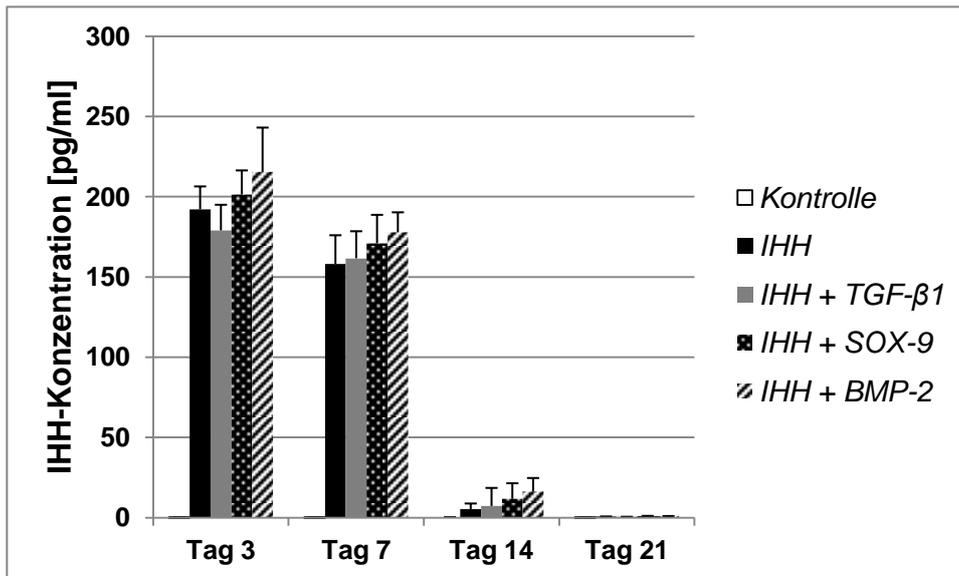


**Abb. 3: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von hMSC-Zellkulturen in Monolayer**  
 Die Abbildung zeigt eine typische Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie von hMSCs in einer Primärkultur (a) sowie nach der 4. Passage (b) auf Zellkultur-Polystyrene. Originalvergrößerung: 50-fach. Skalierungsbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

## 3.2 Bestimmung der Transgenexpression

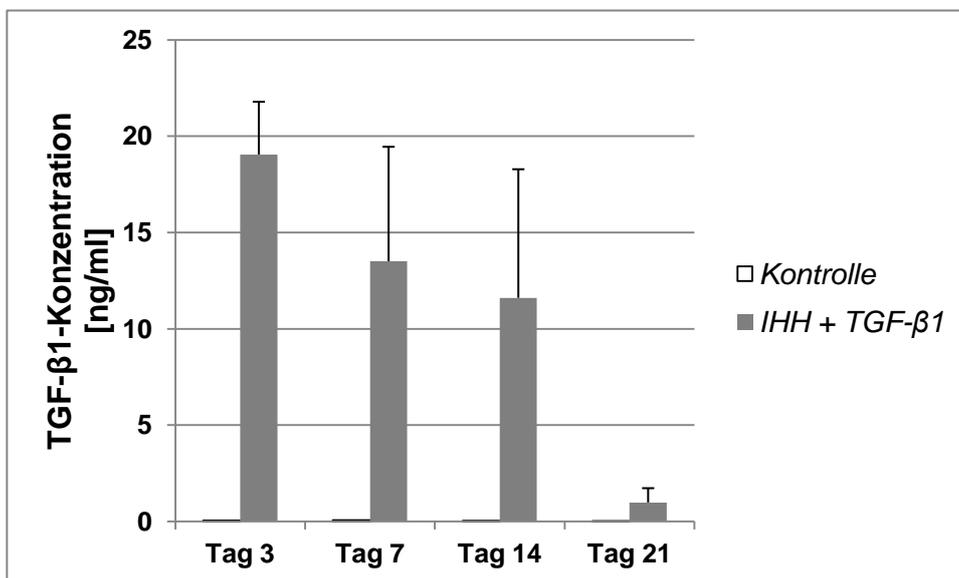
### 3.2.1 Quantitative Bestimmung der Transgenexpression von IHH, TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 mittels ELISA

Die kultivierten, konfluenten hMSCs wurden abtrypsiniert, gezählt, erneut ausgesät und mit  $5 \times 10^2$  infektiösen Viruspartikeln (IVP) pro Zelle mit dem entsprechenden adenoviralen Vektor für etwa 2 h transduziert. Die übertragenen Transgene waren entweder IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2. Als Kontrollgruppe dienten GFP-transduzierte und nicht-infizierte hMSCs. Nachdem die hMSCs aus der Monolayer zu Pellets weiterverarbeitet worden waren, wurden an Tag 3, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 Überstände aus dem Medium der kultivierten Zellen abgenommen und die darin enthaltene Konzentration als 24 h-Akkumulation von rekombinantem IHH-, TGF- $\beta$ 1- und BMP-2-Protein mittels ELISA gemessen. Auf diese Weise konnte zum einen der Erfolg der Transduktion der entsprechenden Transgene auf die hMSCs sichergestellt werden und zum anderen die Höhe der Transgenexpression im Zeitverlauf bestimmt werden.



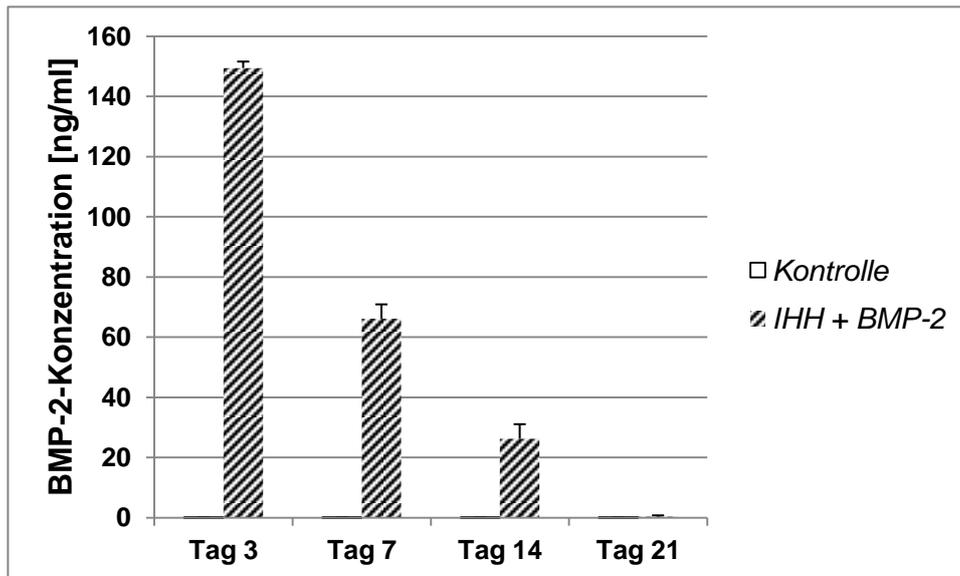
**Abb. 4: IHH-Transgenexpression von hMSC-Pelletkulturen nach adenoviraler Transduktion im Zeitverlauf**

Nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder zusammen mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2 wurde mittels ELISA die Expression des IHH-Transgens im 24 h-Überstand im Zeitverlauf bestimmt. Es zeigte sich eine für den adenoviralen Gentransfer typische Expression des Transgens IHH mit hohen Werten an Tag 3 und Tag 7 sowie rückläufigen Werten im weiteren Zeitverlauf.



**Abb. 5: TGF-β1-Transgenexpression von hMSC-Pelletkulturen nach adenoviraler Transduktion im Zeitverlauf**

Nach Infektion der hMSCs mit rekombinantem Ad.TGF-β1 wurde mittels ELISA die Transgenexpression im 24 h-Überstand im Zeitverlauf bestimmt. Die mit Ad.IHH+TGF-β1 co-transduzierten hMSCs zeigten im Verlauf eine abnehmende Transgenexpression von TGF-β1.



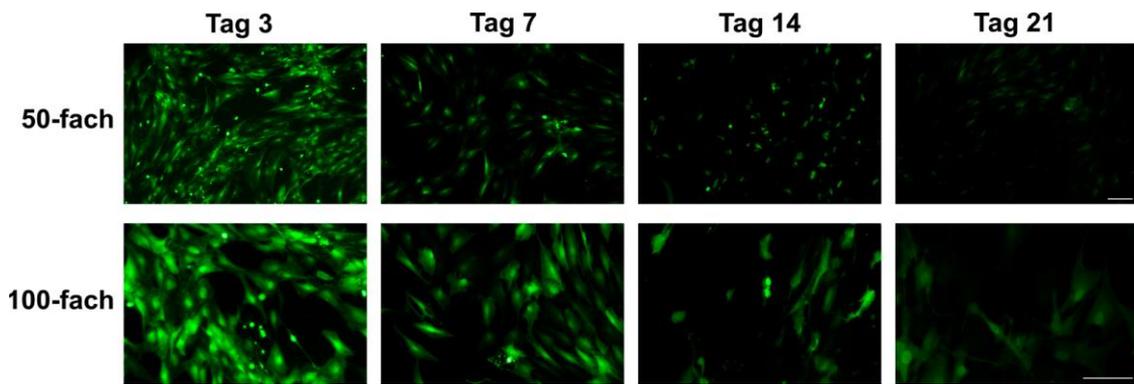
**Abb. 6: BMP-2-Transgenexpression von hMSC-Pelletkulturen nach adenoviraler Transduktion im Zeitverlauf**

Nach Infektion der hMSCs mit rekombinantem Ad.BMP-2 wurde mittels ELISA die Transgenexpression im 24 h-Überstand im Zeitverlauf bestimmt. Die mit Ad.IHH+BMP-2 co-transduzierten hMSCs zeigten im Verlauf eine abnehmende Transgenexpression von BMP-2.

Die rekombinanten Proteine IHH, TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 waren in den entsprechend transduzierten Zellen nachweisbar. Die Pelletkulturen, die mit adenoviralen, für IHH allein oder zusammen mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2 kodierenden Vektoren transduziert worden waren, zeigten dabei eine hohe Transgenexpression an Tag 3 mit Werten im Bereich von 150-250 pg/mL für rekombinantes IHH-Protein, 15-20 ng/mL für rekombinantes TGF- $\beta$ 1-Protein und 140-150 ng/mL für rekombinantes BMP-2-Protein. Die Werte für die Transgenexpression der einzelnen rekombinanten Proteine nahmen im Zeitverlauf ab.

### 3.2.2 Qualitative Bestimmung der Transgenexpression von SOX-9 mittels Fluoreszenzmikroskopie

Durch Verwendung eines adenoviralen Vektors, der ein Fusionsgen von grün fluoreszierendem Protein (GFP) und SOX-9 enthielt, konnte die räumliche und zeitliche Verteilung des SOX-9/GFP-Genproduktes in den transduzierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.



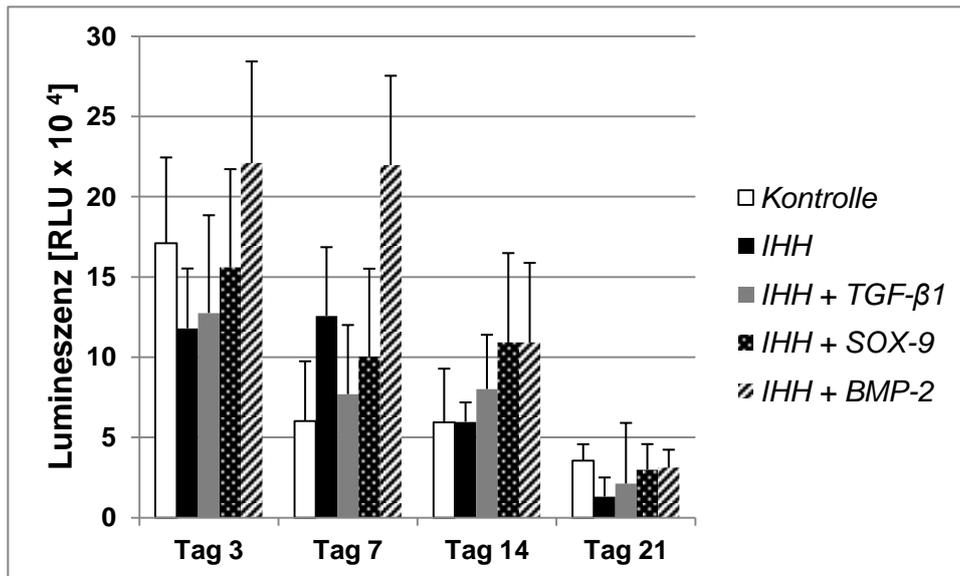
**Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopie von hMSCs in Monolayer nach adenoviraler Transduktion mit IHH und SOX-9**

Nach Transduktion der hMSCs in einer Konzentration von 50 MOI beider Vektoren zeigte sich eine hohe Transduktionsrate mit vielen SOX-9/GFP-positiven Zellen an Tag 3 und eine abnehmende Zahl SOX-9/GFP-positiver Zellen im Zeitverlauf über 3 Wochen. Originalvergrößerung 50-fach, Skalierungsbalken 100  $\mu\text{m}$ . Originalvergrößerung 100-fach, Skalierungsbalken 50  $\mu\text{m}$ .

Dabei zeigte sich eine für den adenoviralen Gentransfer typische, starke Transgenexpression an Tag 3, die im Zeitverlauf abnahm [27, 63, 65].

### 3.3 Quantitative Bestimmung der Zellproliferationsrate mittels Adenosintriphosphat-Assay

Im Adenosintriphosphat (ATP)-Assay wurde zur Bestimmung der Zellproliferationsraten quantitativ die Menge an in den Zellen vorhandenem ATP im Luminometer gemessen. Damit konnte eine Aussage über die Stoffwechselaktivität der mit unterschiedlichen Transgenen infizierten Zellen getroffen werden.



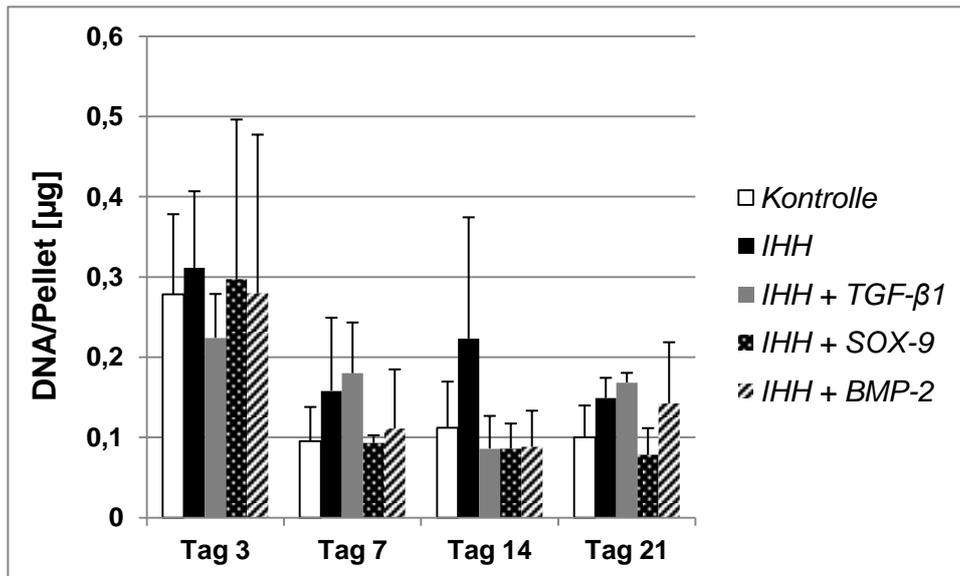
**Abb. 8: Biochemische Analysen von hMSC-Aggregaten im Adenosintriphosphat-Assay nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

Über einen 3-wöchigen Zeitverlauf wurde die Zellproliferation der adenoviral transduzierten Gruppen sowie der Kontrollgruppe in einem biochemischen Adenosintriphosphat-Assay untersucht.

Es zeigten sich dabei in allen Gruppen, ohne Unterschiede zwischen diesen, hohe Proliferationsraten an den Tagen 3 und 7. Dabei wies vor allem an den Tagen 3 und 7 die Co-Transduktionsgruppe IHH+BMP-2 sehr hohe ATP-Werte vor, entsprechend einer hohen metabolischen Aktivität an diesen Tagen.

### **3.4 Quantitative Bestimmung der Zellvitalität mittels DNA-Assay**

Eine Aussage über die Vitalität, Anzahl sowie Proliferationsrate der transduzierten hMSCs sowie der Kontrolle konnte durch Bestimmung des DNA-Gehaltes der Pellets getroffen werden.



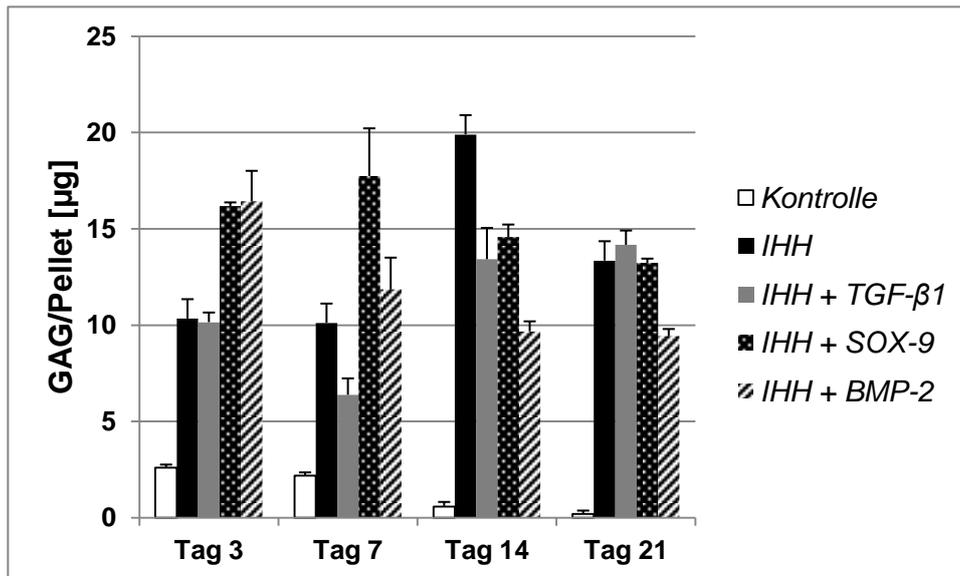
**Abb. 9: DNA-Gehalt in hMSC-Pelletkulturen nach adenoviraler Transduktion**

Im Zeitverlauf über 21 Tage ist die Menge an DNA pro Pellet in den mit IHH unterschiedlich transduzierten Gruppen vergleichbar mit der in der GFP-transduzierten und nicht-transduzierten Negativkontrolle.

Dabei zeigte sich zum einen, dass an Tag 3 im Vergleich zu den folgenden Zellkulturtagen alle Gruppen den höchsten DNA-Gehalt vorwiesen und zum anderen kein erkennbarer Unterschied bezüglich des DNA-Gehaltes zwischen der Kontrolle und den einzelnen IHH-Transduktionsgruppen an den Tagen 3, 7, 14 und 21 bestand.

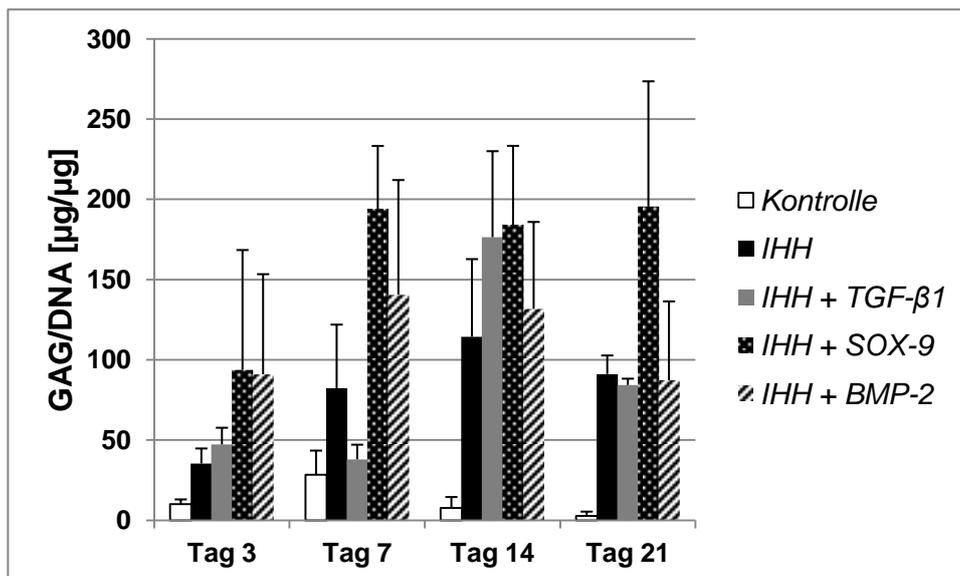
### 3.5 Quantitative Bestimmung des Glykosaminoglykan-Gehaltes mittels DMMB

Mittels der quantitativen Bestimmung des Glykosaminoglykan (GAG)-Gehaltes der Pellets konnte sowohl eine Aussage über die Zellproliferation als auch über die chondrogene Differenzierung der Zellen getroffen werden. GAGs sind wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix, die kovalent an Proteoglykane, die neben den kollagenen Fibrillen einen Hauptbestandteil des hyalinen Knorpelgewebes ausmachen, gebunden sind. GAGs beeinflussen in entscheidendem Ausmaß die physikochemischen Eigenschaften der Proteoglykane [121] und sind daher unter anderem besonders wichtig für die Elastizität des hyalinen Knorpelgewebes.



**Abb. 10: Glykosaminoglykan-Gehalt pro Pellet im Glykosaminoglykan-Assay**

Der Glykosaminoglykangehalt der Pellets wurde an den Tagen 3, 7, 14 und 21 bestimmt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe stellten sich in den IHH-modifizierten Gruppen erhöhte GAG-Werte dar, ohne größere Unterschiede untereinander.



**Abb. 11: Glykosaminoglykan-Gehalt pro DNA im Glykosaminoglykan-Assay**

Der auf den DNA-Gehalt der Zellpellets normierte Glykosaminoglykangehalt nahm in allen IHH-transduzierten Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle im Zeitverlauf zu.

Sowohl die quantitative Bestimmung des GAG-Gehaltes der einzelnen IHH-modifizierten Pellets als auch der Bezug der GAG-Werte zu den dazugehörigen DNA-Werten zeigten im Vergleich zu der nicht behandelten bzw. GFP-transduzierten Kontrollgruppe höhere GAG-Werte. Stellt man die GAG-Werte relativ zu den korrespondierenden DNA-Werten dar, so sieht man zudem, dass

die Menge an produzierten GAGs sowohl in der IHH-Gruppe als auch in den Co-Transduktionsgruppen im Zeitverlauf im Vergleich zu den nicht- bzw. GFP-transduzierten Pellets zunahm. Größere Unterschiede zwischen den einzelnen IHH-Transduktionsgruppen konnten dabei nicht beobachtet werden.

## **3.6 Chondrogene Differenzierung**

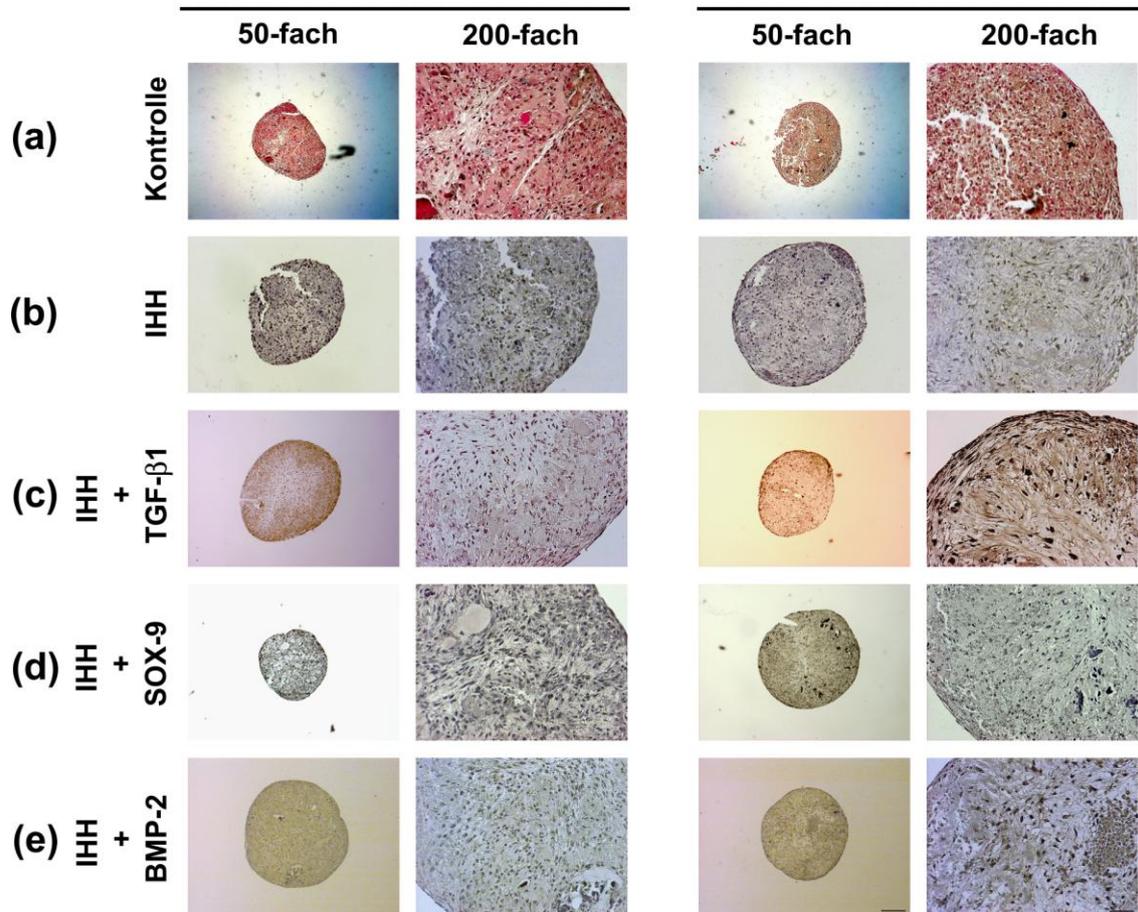
### **3.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

In der allgemeinen Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung wurden hinsichtlich der Pelletgröße, der Menge der Interzellulärsubstanz bzw. der chondrogenen Matrix sowie der Chondronengröße Unterschiede zwischen den einzelnen Zellreihen als ein Maß für die chondrogene Differenzierung der Pellets ersichtlich.

# Hämatoxylin – Eosin

Tag 10

Tag 21



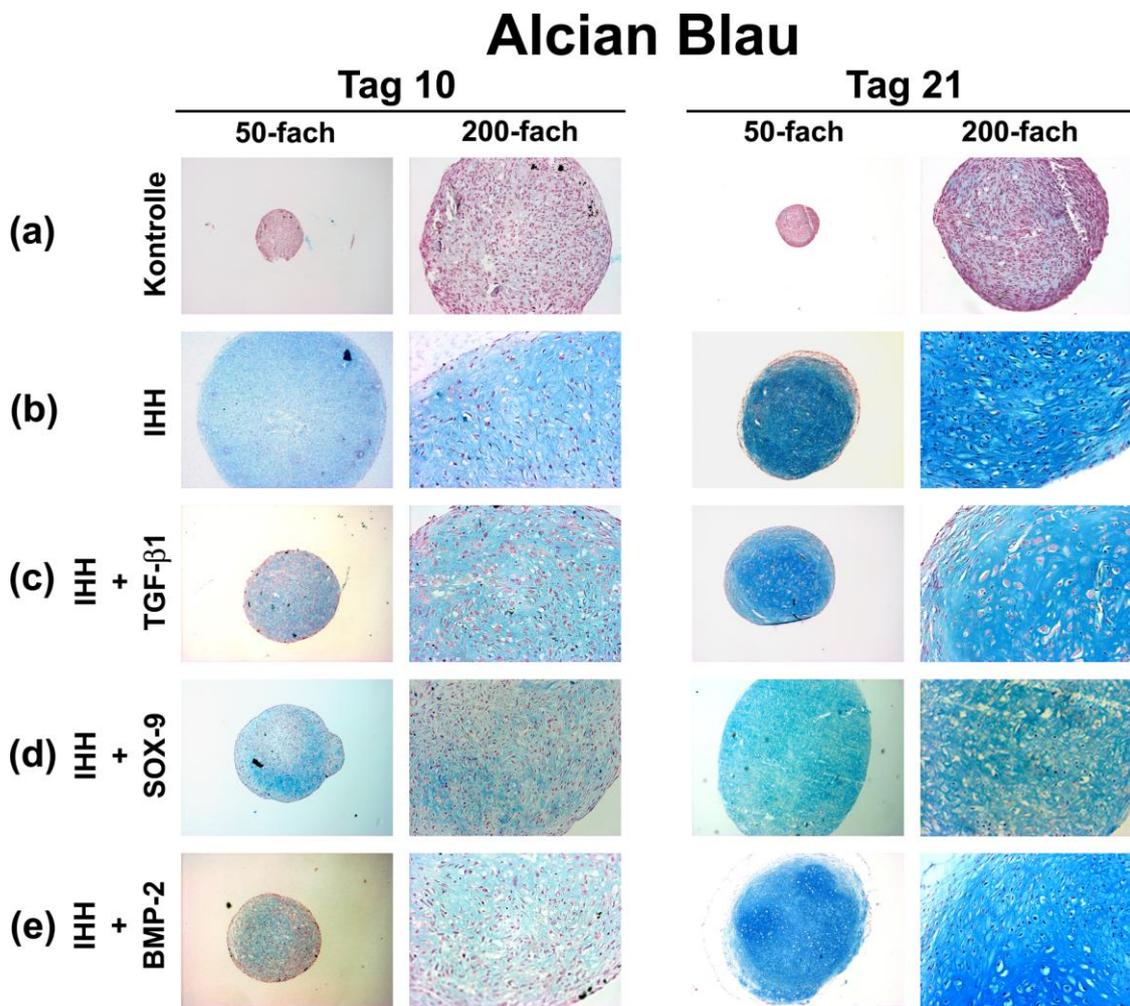
**Abb. 12: Histologische Beurteilung der Chondrogenese von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

Die adenoviral transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Zellzahl und -morphologie der Zellpellets an Tag 10 und Tag 21 beurteilt.

Im Vergleich zu den Negativkontrollen wiesen die mit IHH allein sowie die mit IHH co-transduzierten Gruppen zusammen mit TGF-β1, SOX-9 und BMP-2 deutlich größere Pelletdurchmesser und Chondrone sowie eine gesteigerte Menge an Interzellulärsubstanz auf. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Transduktionsgruppen untereinander herausgearbeitet werden.

### 3.6.2 Alcian Blau-Färbung

Die bläuliche Anfärbung der negativ geladenen Proteoglykane in der extrazellulären Matrix gab einen Hinweis auf das Maß der chondrogenen Differenzierung der unterschiedlichen IHH-Transduktionsgruppen sowie der Negativkontrolle.



**Abb. 13: Histologische Beurteilung der Chondrogenese von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

Die adenoviral transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. In der Alcian Blau-Färbung erfolgte der Nachweis von Matrix-Proteoglykanen der Zellpellets an Tag 10 und Tag 21.

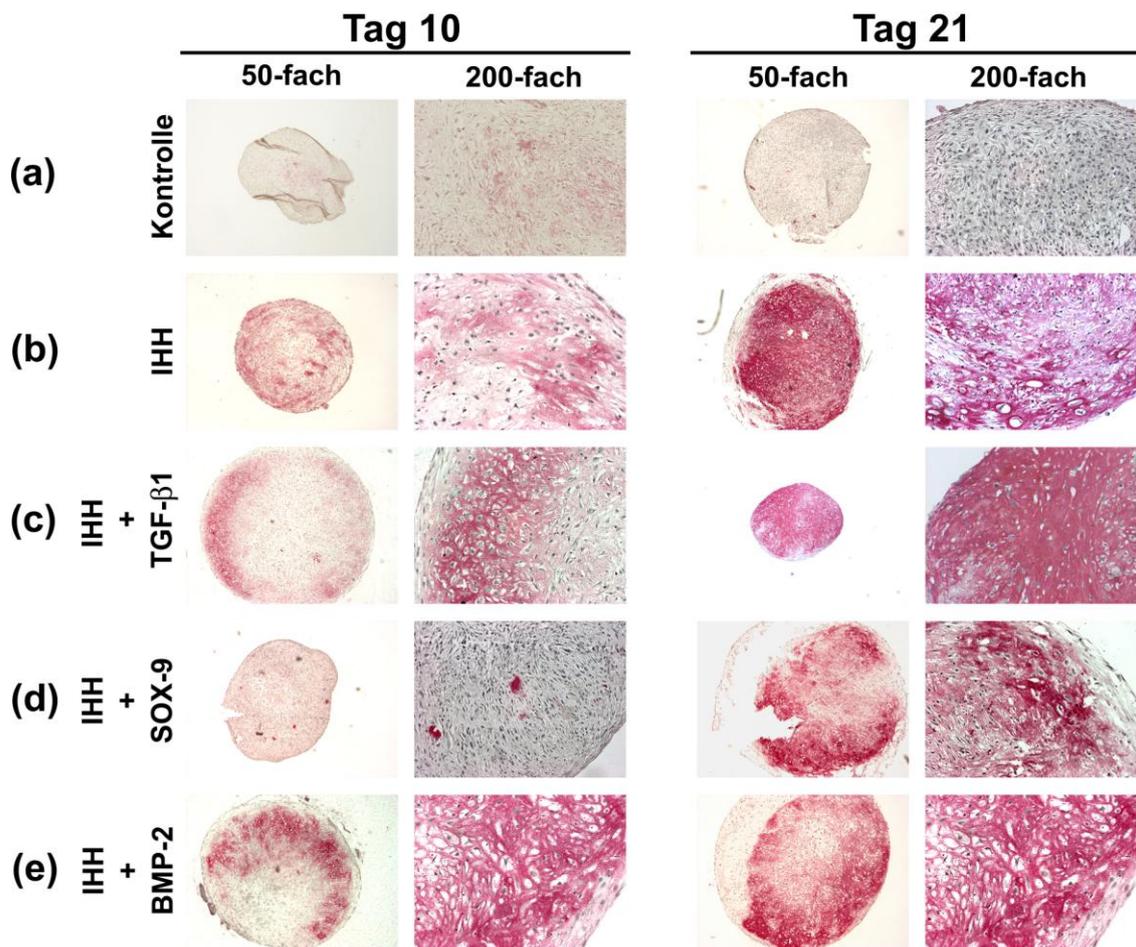
Die Pellets der IHH-Gruppe und IHH co-transduzierten TGF-β1-, SOX-9- und BMP-2-Gruppe zeigten dabei eine stark zunehmende Synthese von Proteoglykanen im Zeitverlauf. Dagegen färbten sich die Pellets der

Negativprobe an Tag 10 und Tag 21 fast gar nicht blau an. In allen IHH-Transduktionsgruppen kam es also bereits an Tag 10 zu einer Synthese von Proteoglykanen, wobei diese an Tag 21 in allen IHH-modifizierten Gruppen am stärksten ausgeprägt war. Größere Unterschiede hinsichtlich der chondrogenen sowie hypertrophen Differenzierung zwischen den einzelnen IHH-Gruppen ließen sich dabei nicht feststellen. Vergleicht man jedoch die homogene Anfärbung, die Anordnung der Zellen, die Chondronengröße sowie das Zytoplasma zwischen den einzelnen IHH-Transduktionsgruppen, so erscheinen die Pellets der IHH+TGF- $\beta$ 1- und IHH+BMP-2-Gruppe durch ihre eher ungleichmäßige Anfärbung innerhalb des Pellets und ihre großen, runden Zellen mit viel Zytoplasma zwar auch chondrogen differenziert, allerdings hypertropher im phänotypischen Erscheinungsbild im Vergleich zu der IHH- sowie IHH+SOX-9-Gruppe.

### **3.6.3 Immunhistochemische Kollagen Typ II-Färbung**

Einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix hyalinen Knorpelgewebes ist das Matrixprotein Kollagen Typ II (Col II), welches zu den wichtigsten Indikatoren für chondrogene Differenzierung gezählt wird. Dabei wurden die Bereiche im Zellpellet immunhistochemisch rot angefärbt, die einen hohen Anteil an Col II exprimierten.

# Kollagen II



**Abb. 14: Immunhistochemische Untersuchungen des Knorpelmatrixproteins Kollagen II von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

Die adenoviral transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. Die immunhistochemische Färbung für Kollagen II wurde am Kultivierungstag 10 und 21 durchgeführt. Die positiv angefärbten Regionen erschienen rot.

Wie in der Abb. 14 zu sehen, wiesen die Pellets der unterschiedlich mit IHH modifizierten Gruppen bereits an Tag 10 kleinere rot angefärbte Areale in ihrer Bindegewebszone vor, wohingegen das Pellet der Negativkontrollgruppe nicht angefärbt wurde und damit keine Zeichen für eine chondrogene Differenzierung zeigte. Zudem wird aus der Abb. 14 ersichtlich, dass sowohl die mit IHH transduzierten Pellets als auch die Pellets der IHH-Co-Transduktionsgruppen mit TGF-β1, SOX-9 und BMP-2 eine gesteigerte Expression von Col II im Zeitverlauf bis zu Tag 21 erkennen ließen. Alle IHH-Transduktionsgruppen

zeigten eine starke Chondrogenese im Zeitverlauf ohne größere erkennbare Unterschiede untereinander.

#### **3.6.4 Immunhistochemische Chondroitin-4-Sulfat-Färbung**

Chondroitin-4-Sulfat (CS-4) stellt als ein kleines Proteoglykan einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpelgewebes dar und eignet sich daher als ein weiterer histologischer Marker für die Chondrogenese.

# Chondroitin-4-Sulfat

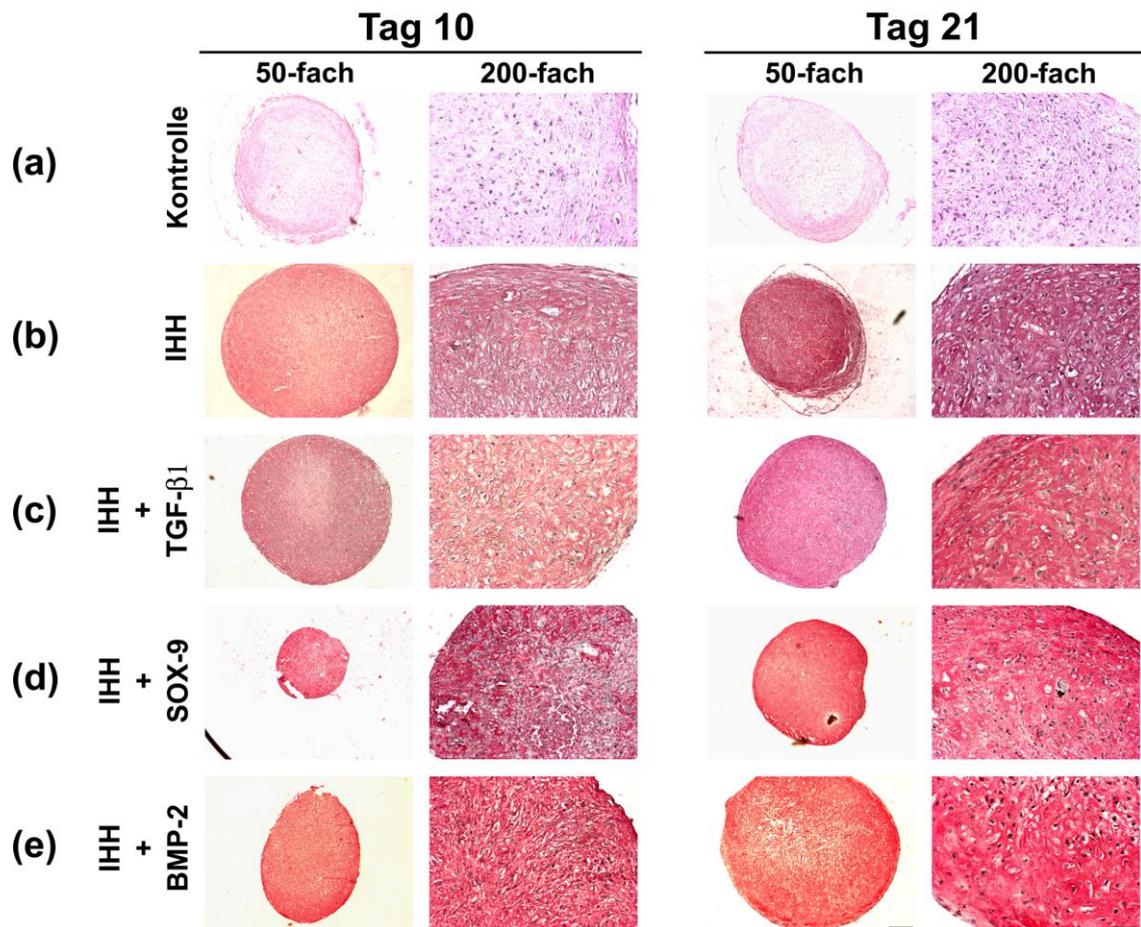


Abb. 15: Immunhistochemische Untersuchungen des Knorpelmatrixproteins Chondroitin-4-Sulfat von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2

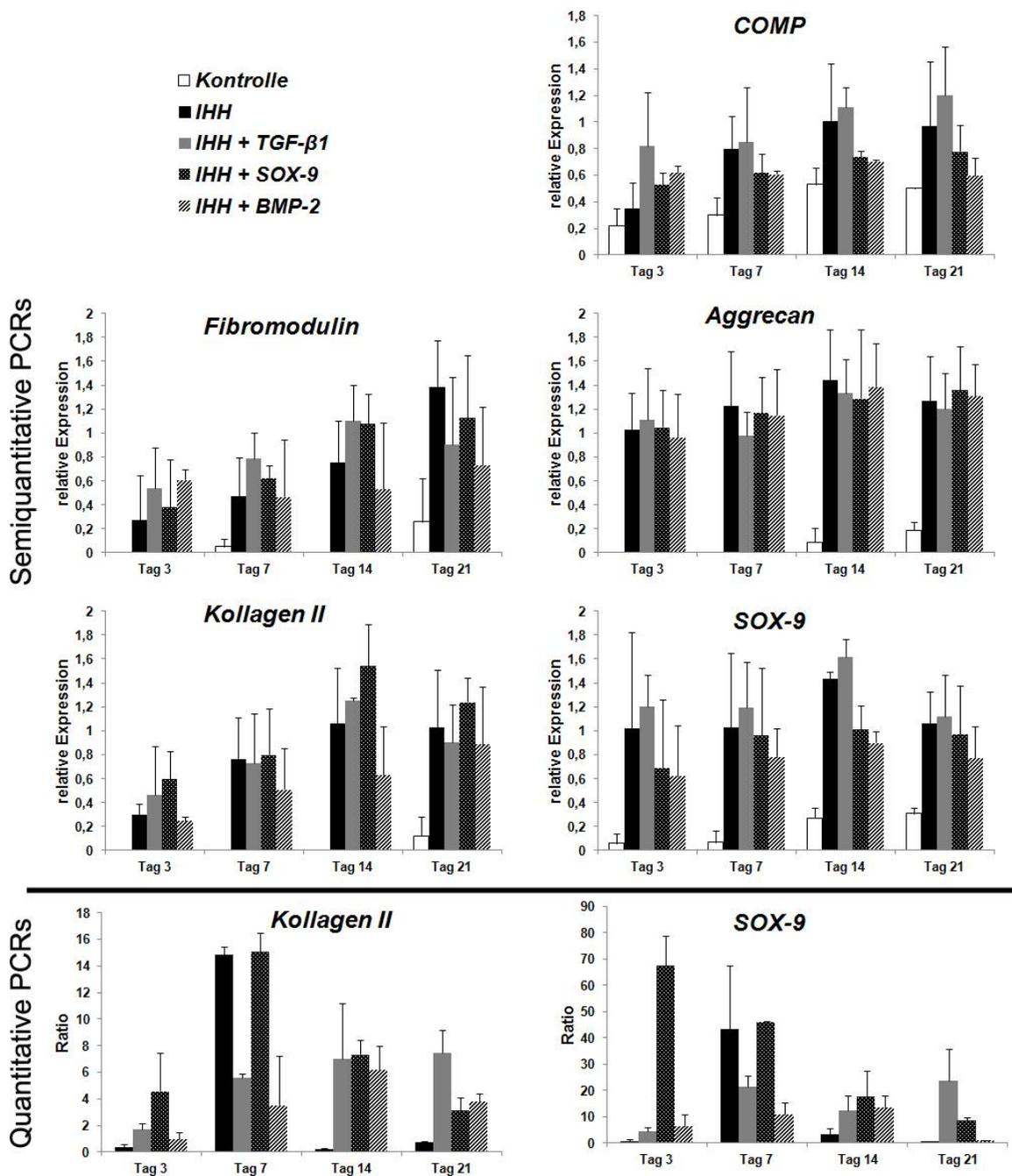
Die adenoviral transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. Die immunhistochemische Färbung für Chondroitin-4-Sulfat wurde am Kultivierungstag 10 und 21 durchgeführt. Die positiv angefärbten Regionen erschienen rot.

Ebenso wie in der immunhistochemischen Col II-Färbung erschienen auch in der CS-4-Färbung die Anteile der Interzellulärsubstanz mit einer hohen Expression an CS-4 rot, wohingegen die Negativkontrolle kaum angefärbt wurde.

Sowohl die Pellets der IHH-Gruppe als auch die der Co-Transduktionsgruppen mit TGF-β1, SOX-9 und BMP-2 zeigten bereits an Tag 10 eine stark positive Anfärbung für CS-4 im Vergleich zu der nicht chondrogenen Negativkontrolle.

### **3.6.5 Semiquantitative und quantitative RT-PCR von knorpelspezifischen Genen**

Um die Auswirkungen des IHH-Gentransfers allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2 auf die Chondrogenese der MSCs zu erforschen, untersuchte ich den zeitlichen Verlauf folgender chondrozytenspezifischer Markergene mittels semiquantitativer RT-PCR: Col II, SOX-9, FMD, AGN sowie COMP. Abb. 16 zeigt die durch die semiquantitative RT-PCR vervielfältigten und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetragenen, knorpelspezifischen Markergene, welche schließlich densitometrisch ausgewertet wurden.



**Abb. 16: Zeitverlauf der Genexpression knorpelspezifischer mRNA von hMSC-Pelletkulturen in der semiquantitativen und quantitativen RT-PCR nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder zusammen mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

Die mit IHH transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. An den Kultivierungstagen 3, 7, 14 und 21 wurde sowohl die semiquantitative Messung der für die Chondrogenese spezifischen mRNAs COMP, Fibromodulin, Aggrecan, Kollagen II und SOX-9 als auch die quantitative Bestimmung von Kollagen II und SOX-9 in der Real-Time-PCR durchgeführt.

Die Expression chondrogener Markergene war sowohl in der IHH-Transduktionsgruppe als auch in den Co-Transduktionsgruppen mit TGF-β1,

SOX-9 und BMP-2 im Vergleich zu der nicht chondrogen differenzierten Negativkontrolle, bei der keine bis wenige chondrogene Markergene nachgewiesen werden konnten, stets an allen Untersuchungszeitpunkten im Zeitverlauf in der semiquantitativen RT-PCR hochreguliert. Betrachtet man die Expression von Col II, einer der Hauptbestandteile hyalinen Knorpelgewebes und damit einer der wichtigsten Marker für die Chondrogenese, so ist die entsprechende mRNA bereits an Tag 3 hochreguliert und wird im Zeitverlauf zu Tag 14 und Tag 21 zunehmend exprimiert. Einen ähnlichen zeitlichen Verlauf zeigte die Expression der mRNA des chondrogenen Markers FMD. Sowohl in der IHH-Gruppe als auch in den Co-Transduktionsgruppen mit TGF- $\beta$ 1 und SOX-9 wurde die Expression von FMD im Zeitverlauf von Tag 3 zu Tag 21 gesteigert. Lediglich die IHH+BMP-2-Gruppe konnte keine im zeitlichen Verlauf steigenden mRNA-Werte für den chondrogenen Marker FMD vorweisen. Sowohl der für die Chondrogenese wichtige Transkriptionsfaktor SOX-9 als auch das Proteoglykan AGN zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle eine Hochregulation der entsprechenden mRNA bereits an Tag 3, die ebenso im Zeitverlauf leicht anstieg. Die mRNA-Synthese des oligomeren Knorpelmatrixproteins (COMP) war ebenso an allen Untersuchungstagen gesteigert, wurde allerdings auch in geringem Maße in den Pellets der Negativkontrolle hochreguliert. Somit konnten keine eindeutig einschneidenden Unterschiede im Expressionsmuster der einzelnen chondrogenen Marker zwischen der IHH-, IHH+TGF- $\beta$ 1-, IHH+SOX-9- sowie IHH+BMP-2-Gruppe herausgearbeitet werden.

Zur genaueren Quantifizierung der Expression knorpelspezifischer Markergene wurden für die Chondrogenese charakteristische Gene (Col II, SOX-9) mittels quantitativer RT-PCR-Analysen untersucht. Unter Verwendung der  $\Delta\Delta$ -CT-Methode konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Negativkontrolle die Markergene Col II und SOX-9 sowohl in der IHH-Gruppe als auch in den Co-Transduktionsgruppen mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 und BMP-2 hochreguliert waren. Dabei zeigten auf bemerkenswerte Weise die IHH+TGF- $\beta$ 1-Gruppe und IHH+BMP-2-Gruppe die höchsten mRNA-Expressionswerte für Col II an Tag 14 und Tag 21, wohingegen die mRNA-Expression für Col II in der IHH-Gruppe sowie der IHH+SOX-9-Gruppe am stärksten an Tag 7 ausgeprägt war. Betrachtet man die Expressionswerte für das Markergen SOX-9, so wird

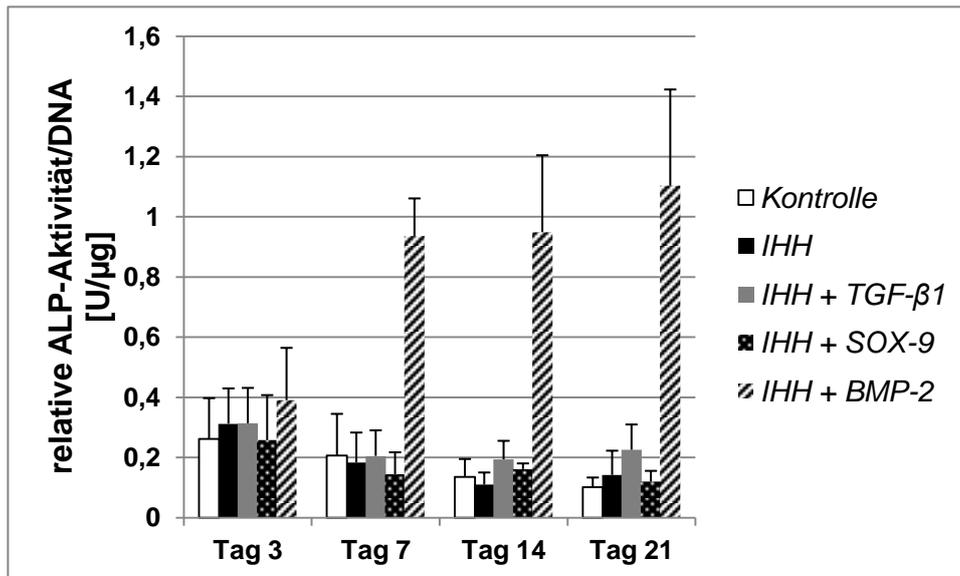
ersichtlich, dass an Tag 3 und Tag 7 in der Co-Transduktionsgruppe Ad.IHH+SOX-9 die höchsten Expressionswerte im Vergleich mit den anderen Gruppen im zeitlichen Verlauf erreicht wurden. Während in der Ad.IHH-Gruppe lediglich an Tag 7 die mRNA von SOX-9 hochreguliert war, zeigte die Ad.IHH+BMP-2-Gruppe hohe SOX-9-Expressionswerte an Tag 7 und Tag 14 sowie die Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1-Gruppe, neben der SOX-9-Co-Transduktionsgruppe, die höchste Expressionsrate der SOX-9-spezifischen mRNA an Tag 21.

Die Ergebnisse der semiquantitativen und quantitativen RT-PCR-Analysen legen eine signifikante Induktion der Chondrogenese in MSCs sowohl durch den adenoviralen Gentransfer von IHH allein als auch durch die Co-Transduktionsgruppen mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 und BMP-2 nahe.

## **3.7 Chondrogene Hypertrophie**

### **3.7.1 Alkalische Phosphatase-Assay**

Das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP) spielt nicht nur eine entscheidende Rolle im Körper beim Knochenaufbau und -umbau, sondern markiert bei der Chondrogenese auch den Beginn der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten. Daher wurde in einem ALP-Assay die zum DNA-Gehalt der Zellpellets relative ALP-Aktivität der unterschiedlich transduzierten MSC-Pellets untersucht.



**Abb. 17: Biochemische Analysen von hMSC-Aggregaten im Alkalische Phosphatase-Assay nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

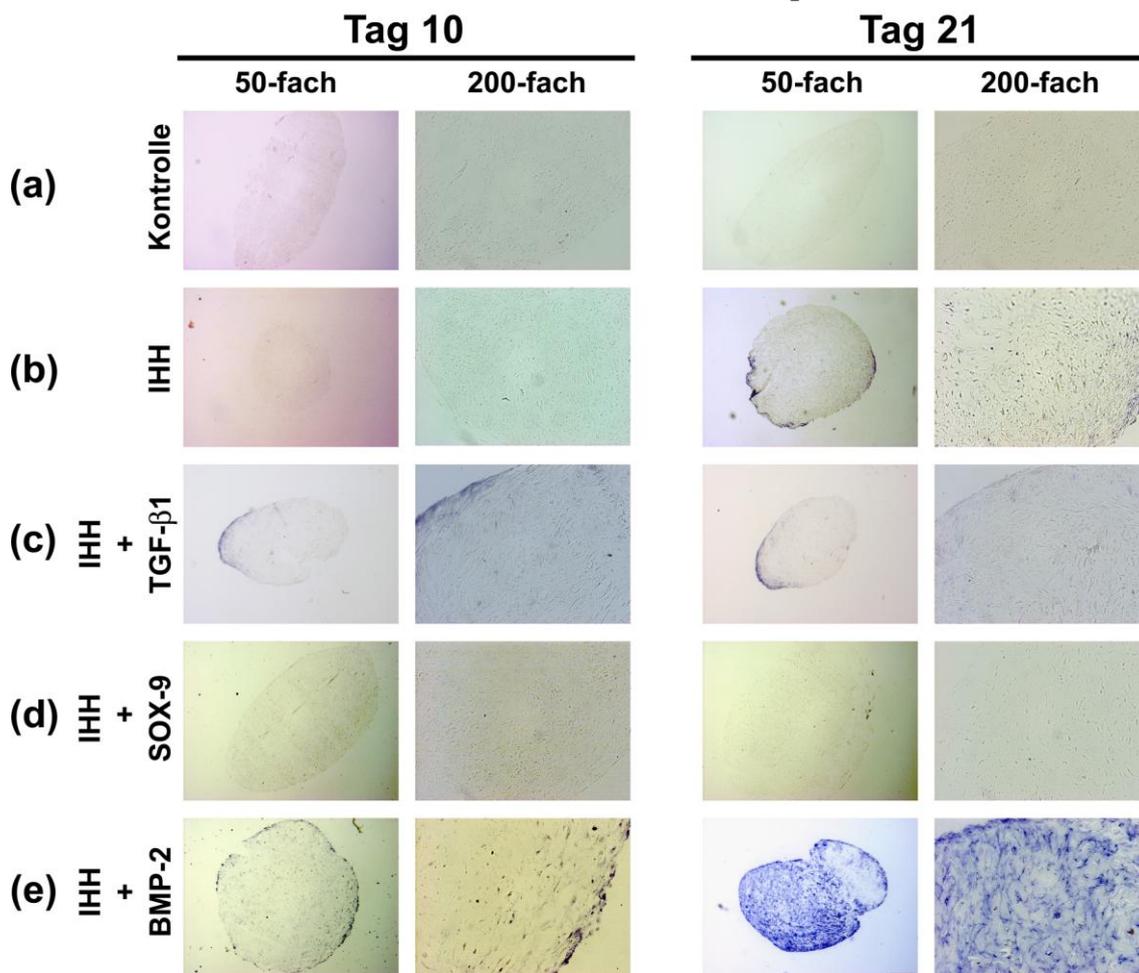
An den Kultivierungstagen 3, 7, 14 und 21 wurde die Alkalische Phosphatase-Aktivität der IHH-transduzierten Gruppen sowie der nicht-transduzierten bzw. GFP-transduzierten Kontrollgruppe, normiert auf den jeweiligen DNA-Gehalt, in einem biochemischen Alkalische Phosphatase-Assay densitometrisch untersucht.

Dabei zeigte insbesondere die Ad.IHH+BMP-2-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich erhöhte Werte für die ALP-Aktivität an Tag 7, Tag 14 und Tag 21, wohingegen die IHH+TGF-β1-Gruppe im Vergleich zur Negativkontrolle lediglich an Tag 21 eine gesteigerte ALP-Aktivität vorweisen konnte. Sowohl in der Ad.IHH-Gruppe als auch in der Ad.IHH+SOX-9-Gruppe konnten keine erhöhten Werte für die Expression der ALP im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

### 3.7.2. Alkalische Phosphatase-Färbung

Da die ALP ein entscheidender Indikator für die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten ist, wurde deren Aktivität semiquantitativ und histochemisch mittels des ALP Detection Kit von SIGMA®, wie in [2.2.3.5] beschrieben, dargestellt.

# Alkalische Phosphatase



**Abb. 18: Histochemische Untersuchung der Hypertrophie von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

Die IHH-transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. Die histochemische Färbung für die Alkalische Phosphatase wurde am Kultivierungstag 10 und 21 durchgeführt. Die positiv angefärbten Regionen erschienen blau.

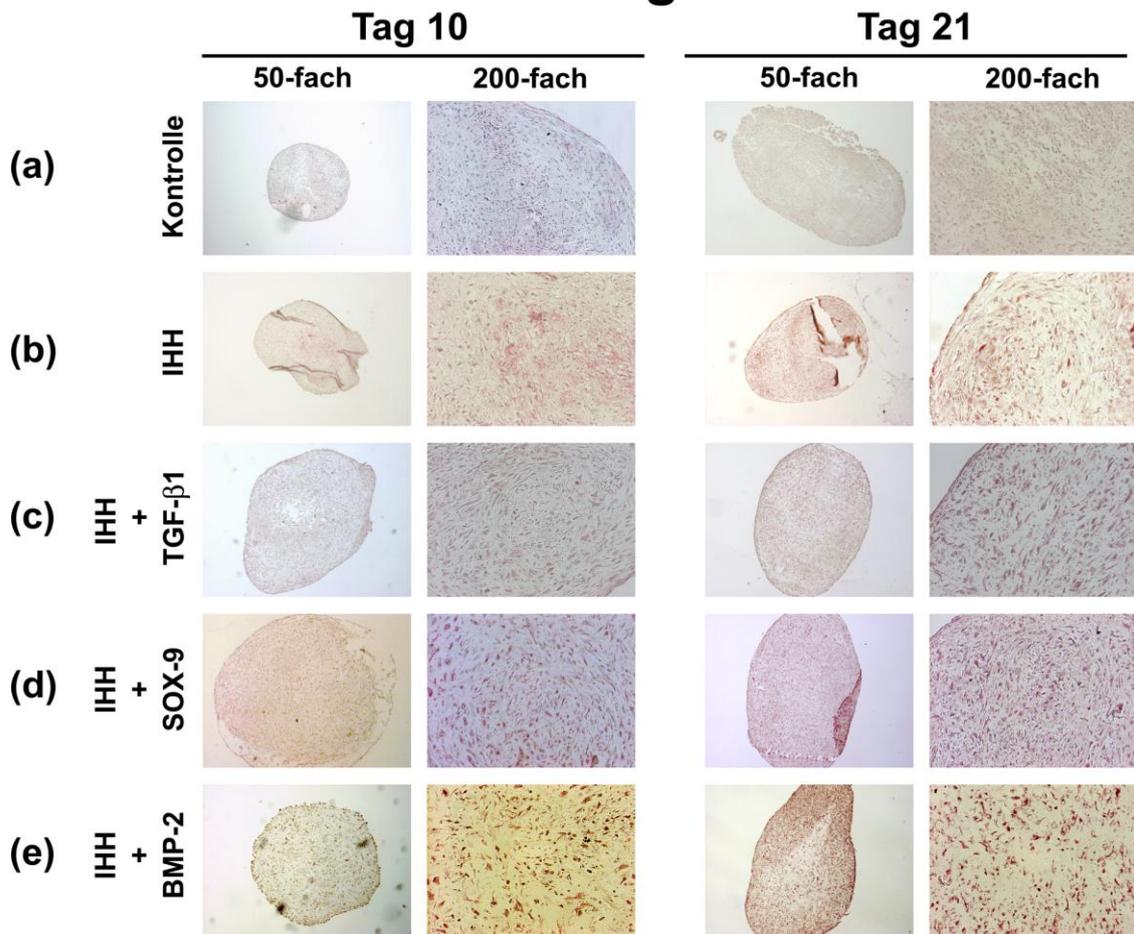
Bereits an Tag 10 wurde die in den Randbereichen der Zellpellets aus der IHH+TGF-β1- und IHH+BMP-2-Gruppe vorhandene ALP leicht angefärbt, wohingegen in der Negativkontrolle, der Ad.IHH- sowie Ad.IHH+SOX-9-Gruppe keine ALP-Expression an Tag 10 nachgewiesen werden konnte. An Tag 21 zeigten die Pellets der IHH+BMP-2-Co-Transduktionsgruppe die mit Abstand stärkste blaue Verfärbung nicht nur im Randbereich des Zellpellets, sondern auch im Bereich der gesamten extrazellulären Matrix. Während die Negativkontrolle sowie die IHH+SOX-9-Gruppe weiterhin keine nachweisbare

ALP-Expression an Tag 21 vorwies, traten in der Ad.IHH-Gruppe und in der Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1-Gruppe im Pelletrandbereich leicht bläulich angefärbte Bezirke auf. Damit zeigte durch Vorhandensein der ALP insbesondere die IHH+BMP-2-Gruppe Zeichen einer hypertrophen Differenzierung im Zeitverlauf.

### **3.7.3 Immunhistochemische Kollagen Typ X-Färbung**

Ein weiterer zuverlässiger Indikator für das hypertrophe Wachstumsstadium im Zuge der chondrogenen Differenzierung der MSCs ist das Kollagen Typ X (Col X), das sich in der immunhistochemischen Färbung rot-braun darstellen ließ.

# Kollagen X



**Abb. 19: Immunhistochemische Untersuchung der Hypertrophie von Zellpellet-querschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

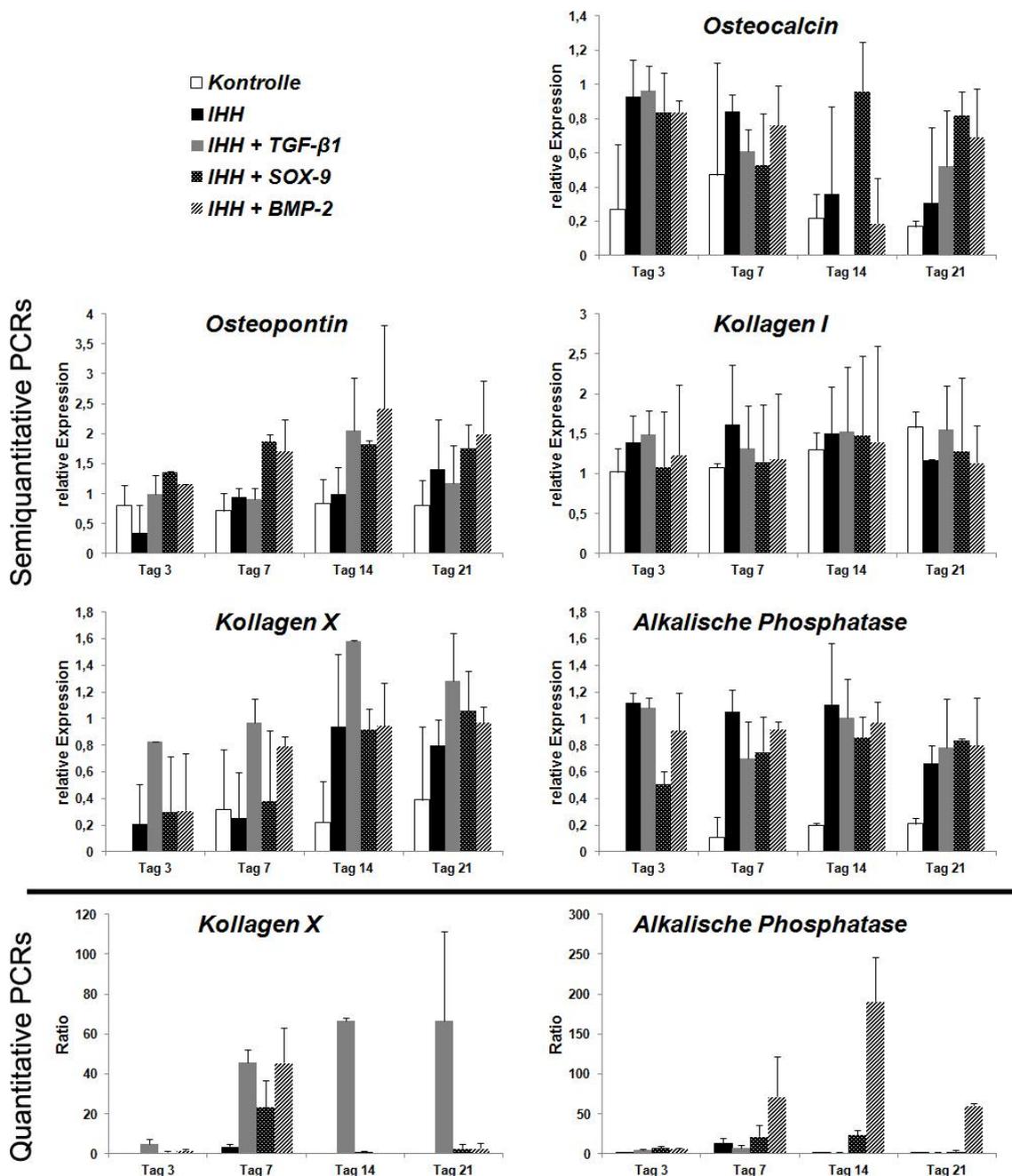
Die IHH-transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. Die immunhistochemische Färbung für Kollagen X wurde am Kultivierungstag 10 und 21 durchgeführt. Die positiv angefärbten Regionen erschienen rot-braun.

Dabei zeigte die Ad.IHH+BMP-2-Gruppe sowohl an Tag 10 als auch an Tag 21 die stärkste, immunhistochemisch nachweisbare Expression von Col X. Im Vergleich zur Negativkontrolle wiesen die IHH-, IHH+TGF-β1- sowie die IHH+SOX-9-Gruppe eine schwache Anfärbung an Tag 10 auf, die etwas im zeitlichen Verlauf zu Tag 21 zunahm.

Die Zeichen einer hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten waren somit insgesamt am stärksten in der immunhistochemischen Col X-Färbung vorhanden, wenn BMP-2 in den differenzierten Zellen co-exprimiert wurde.

### **3.7.4 Semiquantitative und quantitative RT-PCR von hypertrophie-spezifischen Genen**

Zur Bestimmung des hypertrophen und osteogenen Differenzierungsstadiums der mit Ad.IHH, Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1, Ad.IHH+SOX-9 und Ad.IHH+BMP-2 modifizierten und kultivierten MSCs untersuchte ich mittels semiquantitativer RT-PCR-Analysen, analog zu [3.6.5], folgende hypertrophiespezifischen Gene: Col I, Col X, ALP, OP und OC.



**Abb. 20: Zeitverlauf der Genexpression hypertrophiespezifischer mRNA von hMSC-Pelletkulturen in der semiquantitativen und quantitativen RT-PCR nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder zusammen mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2**

Die IHH-transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. An den Kultivierungstagen 3, 7, 14 und 21 wurde sowohl die semiquantitative Messung der für die Hypertrophie spezifischen mRNAs Osteocalcin, Osteopontin, Kollagen I, Kollagen X und Alkalische Phosphatase als auch die quantitative Bestimmung von Kollagen X und Alkalische Phosphatase in der Real-Time-PCR durchgeführt.

Insbesondere nach IHH-Gentransfer allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 und BMP-2 zeigten alle Gruppen an den Kultivierungstagen 3, 7, 14 und

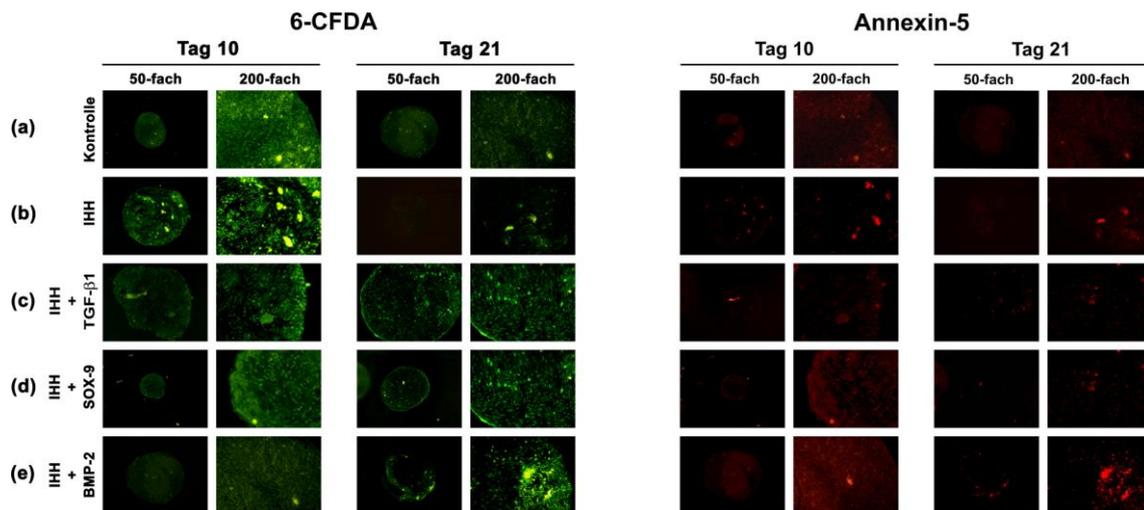
21 erhöhte mRNA-Expressionswerte für die einzelnen hypertrophiespezifischen Gene. Während die IHH-, IHH+TGF- $\beta$ 1-, IHH+SOX-9- sowie die IHH+BMP-2-Gruppe im Vergleich zur Negativkontrolle besonders für die hypertrophen Markergene Col X und ALP erhöhte mRNA-Werte im Zeitverlauf vorwiesen, schien die Expression für Col I, OP und OC, bei entsprechend hohen mRNA-Levels in der Negativkontrolle, nicht stark durch die verschiedenen IHH-Transduktionsgruppen reguliert zu sein. Wie bereits bei den PCR-Analysen für die chondrogenen Markergene konnten somit auch bei den hypertrophen Markern keine weiteren Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen herausgearbeitet werden.

Um das Expressionsmuster von Hypertrophie-assoziierten Markergenen genauer zu untersuchen, wurden für Col X und ALP quantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Während die Expression der Col X-mRNA insbesondere in der IHH+TGF- $\beta$ 1-Gruppe im Zeitverlauf stark anstieg, zeigte die Ad.IHH+BMP-2-Gruppe an Tag 7 und die Ad.IHH+SOX-9-Gruppe in geringerem Ausmaß ebenfalls an Tag 7 erhöhte Expressionswerte für diesen hypertrophen Marker. Die IHH-Gruppe konnte bis auf eine an Tag 7 geringfügig vorhandene Col X-Expression im Vergleich mit der Negativkontrolle keine Hochregulation dieses Markers im Zeitverlauf vorweisen. Dahingegen wurde in der Co-Transduktionsgruppe IHH+BMP-2 eine eindeutige Hochregulation der ALP im zeitlichen Verlauf nachgewiesen, wie bereits im ALP-Assay (Abb. 17) und in der ALP-Färbung (Abb. 18) gezeigt werden konnte. In den anderen IHH-Transduktionsgruppen war die ALP-Expression im Vergleich zu den Negativkontrollen nicht erhöht.

Die semiquantitativen und quantitativen RT-PCR-Analysen der hypertrophiespezifischen Markergene legen den Schluss nahe, dass vor allem die Marker Col X in der Co-Transduktionsgruppe IHH+TGF- $\beta$ 1 und ALP in der Co-Transduktionsgruppe IHH+BMP-2 hochreguliert wurden. Das Phänomen der hypertrophen Differenzierung der IHH-modifizierten MSCs konnte somit bei molekularbiologischen Untersuchungen auf RNA-Ebene durch das Vorhandensein von IHH nicht entscheidend supprimiert werden.

### 3.8 Zellvitalität und Apoptose

Zur Einschätzung der Zellvitalität und Apoptose nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2 im Vergleich zu der Kontrollgruppe untersuchte ich die IHH-transduzierten und nicht-transduzierten bzw. GFP-transduzierten Zellpellets an den Kultivierungstagen 10 und 21 mittels der Zweifach-Fluoreszenzfärbung Annexin V-Cy3/6-CFDA [2.2.3.7].



**Abb. 21: Untersuchung zur Zellvitalität und -apoptose von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100  $\mu$ m) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50  $\mu$ m) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2**

Die IHH-transduzierten Zellen sowie die nicht-transduzierte bzw. GFP-transduzierte Kontrollgruppe wurden für 3 Wochen als Pellets kultiviert bis schließlich die Zellaggregate geerntet und weiterverarbeitet wurden. Die Pelletkulturen wurden am Kultivierungstag 10 und 21 mit 6-CFDA und Annexin-5 zweifach gefärbt. Dabei erschienen die lebenden Zellen grün, die spät-apoptotischen rot, wohingegen die früh-apoptotischen Zellen sowohl den grünen als auch den roten Farbstoff aufnahmen.

Sowohl in der Negativkontrollgruppe als auch in den einzelnen IHH-Transduktionsgruppen konnte als ein Indiz für die Zellvitalität ein gleich hohes Level an grün fluoreszierendem 6-CFDA-Farbstoff nach 10 und 21 Kultivierungstagen nachgewiesen werden. Somit entsprach die Vitalität der IHH-modifizierten MSCs den Zellen aus der Kontrollgruppe. In der Annexin V-Cy3-Apoptosefärbung nahmen nur wenige Zellen aus der Kontrollgruppe sowie der Ad.IHH-, Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1- und Ad.IHH+SOX-9-Gruppe den rot fluoreszierenden Annexin V-Cy3-Farbstoff an Tag 10 und Tag 21 auf,

wohingegen zahlreiche Annexin V-Cy3-positive Zellen in der Co-Transduktionsgruppe IHH+BMP-2 zu sehen waren und damit eine erhöhte Apoptoserate vorwiesen.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Diskussion von Material und Methoden**

#### **4.1.1 Primäre Zellen versus Zelllinien**

Die Vorteile bei der Induktion von Knorpelgewebe durch primäre Zellen, wie etwa MSCs, gegenüber einer Zelllinie, wie etwa C3H10T1/2-Zellen, sind deren größere Variabilität und chondrogene Differenzierungskapazität. Primäre Zellen stellen damit im Gegensatz zu einer standardisierbar zu kultivierenden Zelllinie ein System dar, das sich für in vitro-Versuche zur Untersuchung von Chondrogenese besonders gut eignet. Zwar kann auch durch die aus Mäuseembryos gewonnene, mesenchymale Stammzelllinie C3H10T1/2, die den chondrogenen, osteogenen und adipogenen Differenzierungsweg einschlagen kann, das Phänomen der Chondrogenese untersucht werden [122-123]. Da allerdings C3H10T1/2-Zellen eine homogene Population von multipotenten Zellen bilden, die unter anderem durch den Wachstumsfaktor BMP-2 chondrogen differenziert werden konnten [123], und keine humanen Stammzellen darstellen, ist deren klinische Anwendbarkeit und Aussagekraft aufgrund der geringen Variabilität und des nicht-humanen Ursprungs nicht ausreichend gegeben. Es wurden daher in dieser Arbeit ausschließlich hMSCs von verschiedenen Hüftkopfspendern zur Untersuchung des Phänomens der Chondrogenese verwendet.

#### **4.1.2 Pelletsystem versus andere dreidimensionale Kulturverfahren**

Das Pelletkultursystem zeichnet sich als weit verbreitetes, einfach zu handhabendes Kulturverfahren dadurch aus, dass es den kultivierten Zellen bei der chondrogenen Differenzierung durch seine hohe Zelldichte Interaktionen untereinander erlaubt und dadurch die Kondensationsphase während der endochondralen Ossifikation gut simulieren kann [124]. Als Nachteile dieses Systems sind unter anderem die zu geringe Pelletgröße, um in der klinischen Anwendung bei der Behandlung von größeren Knorpeldefekten herangezogen zu werden, und die Tatsache anzuführen, dass die im Zentrum des Pellets gelegenen Zellen oftmals nekrotisch werden [125]. Dennoch eignet sich aus

oben genannten Gründen das Pelletkultursystem gut, um das Phänomen der chondrogenen Differenzierung von MSCs in vitro zu untersuchen.

Es sind darüber hinaus Tissue Engineering-Ansätze als alternative dreidimensionale Kulturverfahren anzuführen, welche mit verschiedensten Materialien, wie etwa Polymeren, Kollagen-Gelen, Agarose und Alginat, arbeiten. All diese Substanzen stellen letztlich Trägersubstanzen für zu kultivierende Zellen dar, die deren chondrogene Differenzierung durch die Nachahmung einer physiologischen Umgebung unterstützen sollen [126-127]. Jedoch ist die Erzeugung und Handhabung dieser Materialien oftmals teuer und anspruchsvoll sowie das Vorhandensein der Trägersubstanz eine weitere Variable, die das System der chondrogenen Differenzierung mitbeeinflusst. Es wurde daher in dieser Arbeit das Pelletkultursystem aufgrund dessen Vorteile zur grundlegenden Evaluierung des Faktors IHH und dessen Bedeutung bei der Chondrogenese und möglichen Modulation der chondrogenen Hypertrophie verwendet.

#### **4.1.3 Genterapie versus Wachstumsfaktorapplikation**

Ein entscheidendes Problem bei der Behandlung von Knorpeldefekten in vivo ist die Bereitstellung entsprechender Wachstumsfaktoren am Ort des Knorpelschadens in situ. Es ist mittels Genterapie möglich, Zellen ihre eigens benötigten Wachstumsfaktoren herstellen zu lassen. Während rekombinante Proteine in vivo schwierig zu applizieren sind, können durch genetisch veränderte Zellen bestimmte Wachstumsfaktoren am Ort des Defektes synthetisiert und auf eine physiologische Weise in die Umgebung abgegeben werden [27, 128].

Enomoto-Iwamoto konnte in einer Arbeit zeigen, dass ATDC5-Zellen durch Kultivierung mit IHH-Protein zu Chondrozyten differenziert werden können [129]. Ebenso konnten bisher in zahlreichen Versuchen mittels Gentransfer MSCs chondrogen differenziert werden [63, 130]. Durch diese Arbeit wurde letztlich illustriert, dass MSCs mittels adenoviralem IHH-Gentransfer reproduzierbar chondrogen differenziert werden können.

Da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass die Verwendung von zu hohen Adenoviruskonzentrationen bei der Infektion der MSCs sich nachteilig auf deren Chondrogenese auswirken kann [130], wurden in dieser Arbeit die

primären hMSCs mit 500 infektiösen Viruspartikeln pro Zelle, wie bereits in Vorarbeiten [63], transduziert.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Transgenexpression**

Die Transgenexpression von TGF- $\beta$ 1 lag zwischen ca. 18 ng/ml an Tag 3 und 12 ng/ml an Tag 14, wobei insgesamt eine über den Zeitverlauf abnehmende TGF- $\beta$ 1-Expression zu verzeichnen war. Die ebenso über den zeitlichen Verlauf abnehmende BMP-2-Transgenexpression zeigte Werte von ca. 150 ng/ml an Tag 3 nach der Infektion bis zu 30 ng/ml an Tag 21, wohingegen die IHH-Transgenexpression etwas geringer bei Werten zwischen ca. 200 pg/ml an Tag 3 und 10-20 pg/ml an Tag 14 ausfiel. Die SOX-9/GFP-Transgenexpression wurde qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Es zeigte sich auch hierbei eine starke Expression von SOX-9/GFP an Tag 3, die über den Zeitverlauf abnahm.

Die Höhe der Expression der entsprechenden Transgene war in der Kontrollgruppe der Markergen- oder nicht-infizierten Pellets auf Hintergrundniveau (< 10 pg/mL).

Diese Ergebnisse entsprechen bisherigen Erkenntnissen aus dem Bereich der mit adenoviralen Vektoren arbeitenden Gentherapie [27, 63, 70, 131], in der insbesondere an Tag 3 post-infectionem eine sehr hohe Transgenexpression vorliegt, welche dann über den Zeitverlauf abnimmt.

### **4.2.2 Chondrogene Differenzierung**

Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob adenoviraler Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2 dazu geeignet ist, Chondrogenese in primären hMSCs zu induzieren und ob es darüber hinaus dadurch möglich ist, deren hypertrophe Enddifferenzierung zu modulieren.

In dem in dieser Arbeit verwendeten in vitro-Pelletkultursystem führte der Gentransfer von IHH allein zur chondrogenen Differenzierung von primären hMSCs, was sich sowohl in einer positiven Anfärbung der Pellets für Alcian

Blau als auch in positiven immunhistochemischen Anfärbungen für CS-4 und Col II zeigte. Diese Beobachtungen stimmten mit den erhobenen biochemischen Daten überein, die eine starke Erhöhung der GAG- und GAG/DNA-Werte im Zeitverlauf deutlich machten. Die Ergebnisse auf Proteinebene sind ebenfalls kohärent mit den PCR-Ergebnissen, die sowohl in der semiquantitativen als auch in der quantitativen RT-PCR einen starken Anstieg der chondrogenen Differenzierungsmarker zu erkennen ließen. Chondrogene Marker wie Col II, SOX-9, FMD, AGN und COMP waren in den IHH-stimulierten Gruppen deutlich hochreguliert im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die Übereinstimmung von histologischen, biochemischen und molekularbiologischen Genexpressionsdaten bei der chondrogenen Differenzierung von hMSCs zeigte sich auch bei der Co-Expression der Faktoren TGF- $\beta$ 1, SOX-9 und BMP-2 mit IHH, die alle eine starke Erhöhung der chondrogenen Marker im Vergleich zu den Kontrollen induzierten. Die Markergenkontrollen und nicht-transduzierten Kontrollen wiesen zu keinem Zeitpunkt chondrogene Differenzierungsmerkmale in diesem System vor.

#### **4.2.3 Hypertrophe Differenzierung**

Das in der Wachstumsfuge während der endochondralen Ossifikation auftretende Phänomen der chondrogenen Hypertrophie beschreibt den Übergang der proliferierenden Chondrozyten in ein postmitotisches, hypertrophes Stadium. Dabei verändern die hypertrophen Chondrozyten die Struktur und Zusammensetzung der sie umgebenden extrazellulären Matrix, indem sie unterschiedliche Genexpressionsmuster an- bzw. abschalten [67]. Während die Synthese von Col II herunterreguliert wird, nimmt die Expression von Col X, einem für hypertrophe Chondrozyten charakteristischen Marker, zu [67, 72]. Chondrozyten, die sich in einem fortgeschrittenen Abschnitt der Hypertrophie befinden, gleichen zum Teil molekular-phänotypisch Osteoblasten und exprimieren somit auch osteogene Marker wie etwa ALP [64].

Bei der Untersuchung der hypertrophen Differenzierungsmarker zeigte sich im Vergleich zu den chondrogenen Markern ein anderes Bild. Hier wurde durch IHH-Gentransfer allein eine mäßige Erhöhung der hypertrophen Differenzierungsparameter auf histologischer Ebene erzeugt. Diese

Beobachtung stimmte mit den Ergebnissen des ALP-Assays überein, der eine deutliche Hochregulation der ALP im Zeitverlauf deutlich machte. Die semiquantitativen und quantitativen RT-PCR-Ergebnisse waren dazu kohärent und illustrierten hohe Level an Genexpression der hypertrophen und osteogenen Marker. Bei der Co-Expression von TGF- $\beta$ 1 zeigten sich im Vergleich zu IHH allein in allen gemessenen Systemen keine Unterschiede. Im Gegensatz dazu konnte die Co-Expressionsgruppe mit SOX-9 niedrigere und die Co-Expressionsgruppe mit BMP-2 höhere ALP-Werte im quantitativen Vergleich auf Proteinebene vorweisen.

Es lässt sich insgesamt feststellen, dass die histologischen Daten sehr gut mit den Ergebnissen der biochemischen Assays und den PCR-Analysen übereinstimmen. IHH-Gentransfer induzierte eine chondrogene Differenzierung von hMSCs in vitro auf Protein- und Genexpressionsebene, jedoch konnte die chondrogene Hypertrophie der differenzierten hMSCs durch IHH nicht komplett inhibiert werden.

In den semiquantitativen PCR-Analysen schienen die photometrisch ausgemessenen Bandenwerte für Col I, OP und OC in den IHH-transduzierten Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle nicht erhöht zu sein, was auf das Transgen IHH zurückgeführt werden könnte. In Vorversuchen, in denen primäre hMSCs lediglich mit Ad.BMP-2 transduziert worden waren, zeigte sich dahingegen in den semiquantitativen Analysen für die osteogenen Marker Col I und OP eine signifikant gesteigerte Expression im Vergleich zur Negativkontrolle [63]. Zudem wies die Co-Transduktionsgruppe Ad.IHH+BMP-2 eine im Vergleich zu den anderen IHH-modifizierten Gruppen deutlich erhöhte Expression der ALP auf, was wiederum mit den Ergebnissen aus Vorarbeiten übereinstimmt, in denen mit Ad.BMP-2 transduzierte Pellets gesteigerte Expressionsraten von hypertrophiespezifischen Markergenen wie die ALP präsentierten [63].

Bei der Auswertung der Expression des osteogenen Markers Col X konnten in der Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1-Gruppe sowohl in den semiquantitativen als auch in den quantitativen RT-PCR-Analysen die höchsten Werte nachgewiesen werden. Dahingegen war die im Vergleich zu den anderen Transduktionsgruppen erhöhte Expression des hypertrophen Markers Col X in der immunhistochemischen Anfärbung nicht nachweisbar, was wiederum damit

übereinstimmt, dass Ad.TGF- $\beta$ 1-transduzierte Pellets Col X nur in geringem Maße exprimieren [131]. Die in dieser Dissertationsschrift mittels ELISA gemessene Transgenexpression von TGF- $\beta$ 1 betrug an Tag 3 etwa 15-22 ng/mL. Bei Kawamura wurden vergleichbare Werte an Tag 3, bei einer MOI von 100, mit 7-11 ng/mL beobachtet [131]. Die Supplementierungskonzentrationen des chondrogenen Differenzierungsmediums von TGF- $\beta$ 1 wurden von Kawamura mit 50 ng/mL und von Karlsson mit 10 ng/mL [132] angegeben, was zeigt, dass letztlich in allen drei verglichenen Versuchsansätzen, für Tag 3 exemplarisch gezeigt, vergleichbare Mengen an wirksamem TGF- $\beta$ 1-Protein vorlagen. Diese Ausführungen könnten folglich einen Hinweis darauf geben, dass zum einen vor allem die Art der Wachstumsfaktorbereitstellung einen Einfluss auf dessen biologische Wirksamkeit nimmt und zum anderen die behandelten Zellen selbst, durch ihr spezifisches Expressionsmuster, ihr phänotypisches Erscheinungsbild entscheidend mitbestimmen.

Die in dieser Arbeit chondrogen differenzierten hMSCs, die mit Ad.IHH allein oder mit Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1, Ad.IHH+SOX-9 oder Ad.IHH+BMP-2 transduziert worden waren, zeigten zusammenfassend neben eindeutig chondrogenen Merkmalen immer noch Merkmale der hypertrophen Differenzierung, was anzeigt, dass IHH allein als Modulator der Hypertrophie *in vitro* nicht ausreicht. *In vivo*-Studien werden zeigen, ob IHH nicht nur ein chondrogener Induktor von MSCs, sondern auch ein Inhibitor der chondrogenen Hypertrophie ist.

#### **4.2.4 Zellproliferationsraten**

Hinsichtlich der Wachstumsraten der Pelletkulturen konnte in allen IHH-Transduktionsgruppen eine Abnahme der Zellproliferationsrate über den Zeitverlauf festgestellt werden. Dabei zeigte die Co-Transduktionsgruppe IHH+BMP-2 die höchsten Werte für die Zellproliferation (Abb. 8), was mit Ergebnissen aus Vorversuchen übereinstimmt, in denen hohe Proliferationsraten der Zellen und eine damit gesteigerte metabolische Aktivität in den mit Ad.BMP-2 und Ad.BMP-4 transduzierten, über 3 Wochen kultivierten MSCs zu beobachten waren [63].

### **4.3 Vergleich mit entwicklungsbiologischen Studien**

Das derzeitige Wissen über IHH stammt insbesondere aus der Forschung in dem Bereich des sich entwickelnden Skeletts. Während der endochondralen Ossifikation kondensieren Chondrozyten zu knorpeligen Formationen bis sie schließlich aus dem proliferierenden Stadium in eine hypertrophe Differenzierungsphase übergehen, um letztlich zu enddifferenzieren, apoptotisch und durch Knochen ersetzt zu werden [133]. Es konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass IHH als ein Schlüsselfaktor für die Regulierung einiger Schritte der endochondralen Ossifikation angesehen werden kann [66]. IHH selbst steuert die Synthese von PTHrP und wird in seiner Wirkungsweise durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus mit PTHrP reguliert (Abb. 1) [134-136]. Somit kann IHH zum einen indirekt über PTHrP wirken und zum anderen, wie in einigen Studien gezeigt, direkt auf die reifenden Chondrozyten im Bereich der Wachstumsfugen des sich entwickelnden Skeletts Einfluss nehmen [71, 96, 133].

Eine der großen Hürden bei der Erzeugung von hyalinem, langlebigem Knorpelgewebe bleibt die in Vorversuchen mit verschiedenen adenoviral übertragenen Transgenen, wie z. B. BMP-2 und BMP-4 [63], auftretende chondrogene Hypertrophie der differenzierten MSCs. Chondrogene Hypertrophie mündet regelhaft in die Apoptose [63], ein Phänomen, das für die Knorpelregeneration unerwünscht ist. Eine Lösung für das Problem der hypertrophen Enddifferenzierung der chondrogen differenzierten MSCs könnte die Applikation von Faktoren sein, welche die osteogene und hypertrophe Differenzierung in der Wachstumsfuge inhibieren. Da zu diesen Faktoren IHH und PTHrP gehören, ist die Evaluation von IHH im Zusammenhang mit der Modulation der Hypertrophie bei der chondrogenen Differenzierung von MSCs von besonderem Interesse [27, 133].

In einer Studie von Wang et al. wurde postuliert, dass der Transkriptionsfaktor Atf4 zur IHH-Expression in den Chondrozyten und zu dessen parakriner Wirkung auf die Osteoblastendifferenzierung benötigt wird [137]. Atf4 selbst aktiviert in den Osteoblasten OC und in den Chondrozyten IHH [137]. Während der Skelettentwicklung übernimmt dabei der Atf4-Transkriptionsfaktor in den Chondrozyten die Regulation über den Atf4 in den Osteoblasten, um die frühe Phase der Osteogenese und das Skelettwachstum zu regulieren [137].

Des Weiteren wurde in einer Arbeit von Chau et al. die Hypothese untermauert, dass der negative IHH-PTHrP-Rückkopplungsmechanismus während der Embryogenese auch in der postnatalen Skelettentwicklung auftritt [138]. Während die Wachstumsfuge strukturellen und funktionellen Veränderungen im Zuge der postnatalen Entwicklung unterzogen wird, befindet sich die PTHrP-Expression in der verbliebenen Knorpelzone und nicht, wie in der Phase der Embryogenese, im Bereich der periartikulären Zellen [138]. Sowohl während der Embryogenese als auch in der postnatalen Wachstumsphase ist IHH somit entscheidend an der Chondrozytendifferenzierung und -reifung beteiligt [66, 95, 139].

Dabei zeigte eine Studie von Chung et al., dass IHH die Chondrogenese an die Osteogenese in der endochondralen Knochenentwicklung koppelt, indem Schlüsselsignale von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten sowohl an Chondrozyten als auch an Präosteoblasten weitergeleitet werden [136]. Dies könnte die zum Teil in dieser Arbeit aufgetretenen osteogenen Marker nach IHH-Gentransfer in hMSCs erklären.

In einer weiteren Studie von Plaisant et al. wurde wiederum postuliert, dass Hedgehog-Signalmoleküle die humane Osteoblastendifferenzierung hemmen könnten [140]. Zudem wird derzeit in der Literatur davon ausgegangen, dass IHH mit zahlreichen anderen Signalmolekülen, wie etwa Wnt/ $\beta$ -Catenin, in Verbindung steht [141] und beide Moleküle, IHH sowie Wnt/ $\beta$ -Catenin, entscheidend an der Regulierung der Differenzierung von Osteoblasten, der Proliferation von Chondrozyten, deren hypertrophen Differenzierung und Überleben beteiligt sind [142].

Bemerkenswerterweise führte in einer Studie von Tavella et al. die gezielte Expression von SHH in transgen veränderten Mäusen zu einer herunterregulierten IHH-Expression und zu einer heraufregulierten PTHrP-Expression, insbesondere im Bereich der Gelenkoberflächen [143]. Die Aktivierung des Ptc-1-Rezeptors in den Chondrozyten durch SHH konnte somit zusammen mit der gesteigerten PTHrP-Expression das Auftreten der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten verzögern [143], was zeigt, dass nicht nur Vertreter aus der BMP-Proteinfamilie [89], sondern auch andere Mitglieder der Hedgehog-Proteinfamilie, wie etwa SHH, den negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen IHH und PTHrP beeinflussen

können [143]. Zudem geht man derzeit davon aus, dass verschiedene Mitglieder der BMPs, wie z. B. BMP-2, gezielt als sekundäre Signalmoleküle die IHH-Signale zu den periartikulären Perichondriumzellen weiterleiten können, um dort eine PTHrP-Expression zu induzieren [133]. Im Gegenzug könnten durch IHH induzierte BMP-Signale auf die prähypertrophen Chondrozyten zurückwirken und damit die hypertrophe Differenzierung auf die Differenzierung des Periosts abstimmen [133].

Interessanterweise konnten Wang et al. in einer in vivo-Studie zeigen, dass IGF-1 die Regulationseinheit IHH-PTHrP mit beeinflussen könnte [144]. Knock out-Mäuse, die den knorpelspezifischen IGF-1-Rezeptor nicht exprimierten, wiesen ungeordnet aufgebaute Chondrozytenkolumnen, eine verminderte Zellproliferationsrate sowie eine verminderte IHH- und Col II-Expression bei gleichzeitig erhöhter PTHrP-Expression vor [144]. Diese in vivo-Ergebnisse konnten durch in vitro-Versuche, in denen sich IGF-1-Rezeptor-defiziente Zellen durch eine supprimierte Zellproliferationsrate, erhöhte Apoptoserate und eine gesteigerte PTHrP-Synthese auszeichneten, bestätigt werden [144]. Dies könnte darauf hinweisen, dass der IGF-1-Rezeptor entscheidend an dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung sowohl embryonaler als auch postnataler Chondrozyten durch Beeinflussung des IHH-PTHrP-Rückkopplungsmechanismus beteiligt ist [144].

Eine Studie von Hsu et al. zeigte zudem, wie IHH-Signalwege in einem komplexen Netzwerk, bestehend aus weiteren Regulatoren, wie z. B. dem Suppressor des Fused-Proteins (SuFu) und dem aus der Kinesin-Familie stammenden Vertreter Kif7, entscheidend beeinflusst werden können [145].

Ein weiterer entscheidender Effektor in dem Regulationsnetzwerk, in dem IHH und PTHrP als zentrale Signalmoleküle für die Steuerung der endochondralen Ossifikation fungieren, scheint Zfp521 zu sein [146]. Zfp521 ist ein transkriptioneller Coregulator aus der Gruppe der Zinkfingerproteine, dessen Expression durch PTHrP gesteigert werden kann und der ein weiterer wichtiger Regulator der Chondrozytenproliferation und -differenzierung zu sein scheint [146]. In einem in vivo-Mausmodell wiesen Chondrozyten mit einer Deletion für das Zfp521-Gen eine verminderte Chondrozytenproliferation sowie eine früher eintretende hypertrophe Enddifferenzierung vor [146]. Zudem konnte in einem in vitro-Versuch mit mesenchymalen Zellen von Wu et al. gezeigt werden, dass

die Expression von Zfp521 durch BMP-2 herabreguliert werden und Zfp521 selbst die Differenzierung von Osteoblasten hemmen kann [147].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Beobachtungen aus dem Bereich der Skeletogenese stark mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit übereinstimmen. Die primären hMSCs konnten mittels IHH-Gentransfer chondrogen differenziert werden, wobei IHH einzelne Schritte der Chondrogenese, wie etwa die Proliferation, Differenzierung, Hypertrophie und Apoptose, effektiv induzieren und regulieren konnte. Jedoch muss aufgrund der forcierten Überexpression von IHH davon ausgegangen werden, dass das fein abgestimmte IHH-PTHrP-Regulationssystem durch die Transduktion von IHH auf die MSCs in ein Ungleichgewicht gekommen sein könnte und somit das Phänomen der Hypertrophie nicht vollkommen unterdrückt werden konnte.

#### **4.4 Vergleich mit anderen in vitro-Studien zur Knorpelregeneration**

Die mit Ad.IHH sowie Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1, Ad.IHH+SOX-9 und Ad.IHH+BMP-2 transduzierten MSCs konnten im in vitro-Pelletkultursystem reproduzierbar chondrogen differenziert werden, wie zum einen qualitativ durch die Alcian Blau-, CS-4- und Col II-Färbung und zum anderen quantitativ durch den GAG-Assay gezeigt werden konnte.

Dies entspricht Ergebnissen aus einem in vitro-Modell, in dem TGF- $\beta$ 1 [27, 70], BMP-4 [63] oder BMP-2 [27, 63, 70] mittels adenoviralem Gentransfer auf primäre hMSCs übertragen wurden. Vergleicht man jedoch das Ausmaß der chondrogenen Differenzierung der mit IHH co-transduzierten MSCs mit dem chondrogenen Phänotyp der nur durch IHH modifizierten Zellen, so können keine synergistischen Effekte durch die Kombination von mehreren Transgenen beobachtet werden (Abb. 10-16). Dies stimmt wiederum mit Ergebnissen aus dem Bereich des kombinierten Gentransfers von TGF- $\beta$ 1 und BMP-2 im gleichen Versuchsmodell überein, in dem es ebenso zu keinen additiven Wirkungen kam [130]. Dahingegen konnten synergistische Effekte auf die Transgenexpression sowie auf die Chondrogenese durch den adenoviralen Gentransfer von TGF- $\beta$ 1 oder BMP-2 zusammen mit IGF-1 auf MSCs nachgewiesen werden [130], was darauf hindeutet, dass die Wahl der

kombinierten Transgene eine zentrale Rolle für die Erzeugung von synergistischen Effekten spielt.

Das Phänomen der chondrogenen Hypertrophie der differenzierten hMSCs war am stärksten in der Co-Transduktionsgruppe IHH+BMP-2 ausgeprägt. Diese Ergebnisse stehen somit auch mit Beobachtungen aus Vorversuchen im Einklang, in denen mit Ad.BMP-2 transduzierte Pellets phänotypisch mehr hypertrophe Merkmale als mit Ad.TGF- $\beta$ 1 [130] oder Ad.BMP-4 [63] transduzierte Gruppen zum Vorschein brachten.

Eine Studie von Kawamura et al. zeigte, dass MSC-Pellets, die in einem mit 50 ng/mL TGF- $\beta$ 1 supplementierten Medium chondrogen differenziert wurden, in der Immunfluoreszenz-Untersuchung deutlich mehr Col X vorwiesen als die mit Ad.TGF- $\beta$ 1 transduzierte Vergleichsgruppe [131]. In einer Studie von Karlsson et al. wurde ebenso offensichtlich, dass mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) chondrogen differenzierte primäre hMSCs neben Col I, Col IIa und Col IIb auch Col X exprimierten und damit einen „gemischt-hyalinen“ Phänotyp präsentierten [132]. Diese unterschiedlichen Expressionsmuster von Col X nach viraler Transduktion von TGF- $\beta$ 1 auf die MSCs oder chondrogener Differenzierung der MSCs mit TGF- $\beta$ 1-Protein angereichertem Medium mögen auf die unterschiedliche Proteinverteilung und -wirkung, je nach Methode, zurückzuführen sein.

In einer Studie von Mwale et al. wurde gezeigt, dass mit TGF- $\beta$ 1 chondrogen differenzierte MSCs zum Teil vor der Col II-Expression Col X in der semiquantitativen RT-PCR exprimierten, allerdings das Protein Col X im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte [148]. Dies stimmt mit der in dieser Arbeit beobachteten Feststellung überein, dass Col X zum Teil nur als mRNA in den differenzierten MSCs vorlag und immunhistochemisch keine Expression von Col X sichtbar wurde. Zum einen könnte man aus all diesen Ergebnissen ableiten, dass die mRNA von Col X als hypertropher Marker von chondrogen differenzierten MSCs mit Vorsicht zur Beurteilung des Differenzierungsgrades von Zellen herangezogen werden sollte. Zum anderen bleibt durch weitere in vitro- und in vivo-Versuche zu klären, ob eine Col X-Expression in einigen MSCs zum Teil konstitutiv vorhanden ist und des Weiteren auch von Faktoren wie Alter, Geschlecht, Erkrankung sowie ggf. medikamentöser Therapie des Stammzellspenders abhängt [148-149].

In einer Studie von Kellner et al. konnte gezeigt werden, dass durch rekombinante Hedgehog-Proteine die GAG-Synthese der auf biologisch abbaubaren Polyglykolsäure-Scaffolds angezüchteten Chondrozyten gesteigert werden konnte [36]. Die dipalmitoylierten Hedgehog-Proteine IHH und SHH wurden in einer Konzentration von 1000 ng/mL dem Kultivierungsmedium hinzugefügt und konnten beide in gleichem Maße die GAG-Synthese in den angezüchteten Chondrozyten steigern [36]. Im Gegensatz dazu wurde IHH in dieser Arbeit nach adenoviraler Übertragung auf die MSCs in einer Konzentration von 150-250 pg/mL am Kultivierungstag 3 im Überstand nachgewiesen und konnte bereits in dieser Menge effizient die GAG-Produktion der transduzierten MSC-Aggregate steigern, was wahrscheinlich auf die gleichmäßige, perizelluläre Verteilung des IHH-Transgenproduktes zurückgeführt werden kann (Abb. 4, 10, 11).

In einer weiteren Studie von Enomoto-Iwamoto et al. konnten Zellen der chondrogenen, klonalen Zelllinie ATDC5, die aus embryonalen Karzinomzellen der Maus isoliert worden waren [150], mithilfe von rekombinantem IHH-Protein chondrogen differenziert werden, was durch Veränderungen in der Zytoarchitektur, positive Ergebnisse in der Alcian Blau-Färbung sowie eine gesteigerte GAG-Produktion der Zellen nachgewiesen wurde [129].

Zudem konnte in einem in vitro-Versuch mit ATDC5-Zellen gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 signifikant die BMP-Signaltransduktion steigert, wohingegen BMPs die Signalwirkung von TGF- $\beta$ 1 inhibieren [151]. Diese Interaktionen zwischen TGF- $\beta$ 1 und Vertretern aus der BMP-Familie sind somit in gewisser Weise mit dem negativen Rückkopplungsmechanismus zwischen IHH und PTHrP vergleichbar und könnten ebenso wie dieser entscheidend an der Proliferationsregulation der Chondrozyten beteiligt sein [151].

Ebenso konnte bereits durch PTHrP die hypertrophe Enddifferenzierung von chondrogen differenzierenden MSCs inhibiert werden [152-153].

Warzecha et al. konnten zeigen, dass MSCs mit SHH-Protein in vitro chondrogen differenziert werden können [154]. Ob mittels verschiedener Hedgehog-Faktoren die Chondrogenese und Hypertrophie bei der Differenzierung von MSCs im Zuge der Knorpelregeneration in vivo beeinflusst werden können, bleibt abzuwarten.

## 4.5 Vergleich mit in vivo-Studien zur Knorpelregeneration

Infolge der forcierten Überexpression von IHH scheint es möglich zu sein, dass das fein abgestimmte IHH-PTHrP-Regulationssystem in ein Ungleichgewicht gekommen sein könnte und somit das Phänomen der Hypertrophie nicht vollkommen unterdrückt werden konnte. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie von Minina et al., in der eine Überexpression von IHH in den Knorpelarealen von transgen veränderten Mäusen zu einer Hochregulation der PTHrP-Expression sowie zu einem verspäteten Auftreten der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten führte [89].

Diese Ergebnisse stimmen auch mit in einer in vivo-Studie von Lee et al. überein, in der gezeigt werden konnte, dass PTHrP als parakriner Faktor das Längenwachstum in der Wachstumsfuge durch Verlangsamung der Chondrozytenentwicklung und -differenzierung entscheidend mitregulieren und damit die chondrogene Hypertrophie supprimieren kann [155].

In einem Modell mit transgenen Mäusen von Keller et al. konnte gezeigt werden, dass fehlende BMP-2-Signale in vivo proliferierende Chondrozyten hemmen, zu prähypertrophen Chondrozyten zu differenzieren [151]. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass BMP-Signale entscheidend an der hypertrophen Differenzierung von proliferierenden Chondrozyten beteiligt sind.

SHH, ein Vertreter aus der Hedgehog-Proteinfamilie, wurde bereits von Grande et al. in einer in vivo-Studie zur Knorpelregeneration eingesetzt [156]. Dazu wurden vom Periost im Bereich der proximalen Tibia gewonnene MSCs zum einen mit SHH und zum anderen mit BMP-7 transduziert, in vitro kultiviert, auf ein Polyglykolsäure-Scaffold gebracht und schließlich in einen osteochondralen Defekt im Bereich der Trochlea von Kaninchen eingesetzt [156]. Dabei wurde der Knorpeldefekt sowohl von den SHH als auch von den BMP-7 transduzierten MSCs mit hyalin-ähnlichem Knorpelgewebe im Zeitverlauf aufgefüllt [156]. Jedoch zeigte die BMP-7-Gruppe ein wesentlich schnelleres Remodeling von Knorpel- zu Knochengewebe im subchondralen Kompartiment als die SHH-Gruppe. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass BMP-7 sowohl die chondrogene als auch die osteogene Differenzierung von multipotenten MSCs induziert [157]. Allerdings wurde das Thema der Hypertrophie unter Verwendung von SHH in der Arbeit von Grande et al. nicht weitergehend untersucht.

Eine *in vivo*-Studie von Gelse et al. konnte ebenso zeigen, dass BMP-2 transduzierte, periostale Zellen durch verstärkte Expression des Hypoxie-induzierenden Faktors-1alpha (HIF-1alpha) chondrogen differenziert werden konnten [79], was durch eine BMP-2-Signalwirkung zwischen Chondrozyten und Periostzellen erklärt werden könnte. Die Ergebnisse aus dieser Dissertationsschrift stehen damit im Einklang: Im Vergleich zu Ad.IHH, Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1 sowie Ad.IHH+SOX-9 wies die Co-Transduktionsgruppe IHH+BMP-2 die stärksten Zeichen für Hypertrophie und Apoptose vor (Abb. 17-21).

Es wurde in der Literatur bereits, im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit, von synergistischen Effekten zwischen IHH und BMP-2 bei der chondrogenen Differenzierung von ATDC5-Zellen *in vivo* berichtet [129]. Die Abweichung zwischen dieser *in vitro*-Studie und des *in vivo*-Versuchsaufbaus von Enomoto-Iwamoto et al. könnte dadurch begründet sein, dass in der *in vivo*-Studie zum einen die Faktoren IHH und BMP-2 exogen appliziert wurden und zum anderen eine Zelllinie verwendet wurde, die ein anderes Differenzierungspotential als primäre MSCs besitzt.

Zusätzlich konnte zu diesen Ergebnissen in einem *in vivo*-Versuch gezeigt werden, dass die Implantation von mit IHH transgen modifizierten Fibroblasten in Nacktmäuse sowohl ektopes Knorpelgewebe als auch eine im Verlauf einsetzende Knochenbildung induzieren konnte [129].

Diese Ergebnisse zeigen auf, dass IHH ein großes Potential bei der Behandlung von Knorpeldefekten *in vivo* in sich bergen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob mittels IHH-Gentransfer aus Hüftköpfen gewonnene hMSCs chondrogen im Pelletkultursystem differenziert werden können und ob zugleich durch IHH eine Modulation der hypertrophen Enddifferenzierung der hMSCs in diesem System möglich ist.

IHH bestimmt in der Wachstumsfuge zusammen mit PTHrP während der endochondralen Ossifikation die Chondrozytenreifung und -differenzierung entscheidend mit [66] und ist daher ein interessanter Kandidat zur Induktion von hyalinem oder zumindest hyalin-ähnlichem Knorpelgewebe in der stammzellbasierten Gentherapie.

Nach Gewinnung und Kultivierung der hMSCs wurden diese mit Ad.GFP, Ad.IHH, Ad.IHH+TGF- $\beta$ 1, Ad.IHH+SOX-9 oder Ad.IHH+BMP-2 transduziert bzw. ein Teil für die Negativkontrolle nicht transduziert und im Anschluss alle Gruppen zu Pellets weiterverarbeitet. Histologische, biochemische sowie molekularbiologische Untersuchungen wurden an verschiedenen Zeitpunkten zur Evaluierung des chondrogenen Differenzierungsgrades sowie der hypertrophiespezifischen Merkmale der kultivierten Pellets durchgeführt.

Es konnte durch diese Arbeit sowohl auf Proteinebene als auch auf Genexpressionsebene reproduzierbar gezeigt werden, dass primäre hMSCs im Pelletkultursystem sowohl durch den adenoviralen Gentransfer von IHH allein als auch durch die Co-Transduktionsgruppen IHH+TGF- $\beta$ 1, IHH+SOX-9 und IHH+BMP-2 chondrogen differenziert werden können. Dabei zeigten alle IHH-modifizierten Pellets Col II- und CS-4-positive immunhistochemische Anfärbungen, eine gesteigerte Synthese von Glykosaminoglykanen im biochemischen GAG-Assay sowie eine Hochregulation von mit der Chondrogenese assoziierten Genen.

Das Auftreten hypertropher Merkmale bei den chondrogen differenzierten MSCs konnte durch IHH-Gentransfer nach 3 Wochen in vitro-Kultivierung nicht vollkommen unterdrückt werden, war jedoch besonders stark ausgeprägt, wenn BMP-2 co-exprimiert wurde und war etwas weniger evident in der IHH+SOX-9-Gruppe. Dabei zeigte die Ad.IHH+BMP-2-Gruppe sowohl in der ALP-Färbung als auch in dem ALP-Assay und der quantitativen RT-PCR die stärkste Hochregulierung des hypertrophen Markers ALP.

Möglicherweise brachte die Überexpression von IHH das fein aufeinander abgestimmte Regulationssystem zwischen IHH und PTHrP aus dem Gleichgewicht und könnte als ein Grund dafür angeführt werden, warum die Hypertrophie im Pelletkultursystem nicht vollkommen supprimiert werden konnte.

Es bleibt abzuwarten, ob IHH in vivo die Chondrogenese induzieren und dabei zugleich das Phänomen der chondrogenen Hypertrophie regulieren kann. In der Zukunft würde dies letztlich der stammzellbasierten Knorpelregeneration in vivo zu Gute kommen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Buckwalter, J.A. & Mankin, H.J. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum* 41, 1331-1342 (1998).
2. Hunziker, E.B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432-463 (2002).
3. Newman, A.P. Articular cartilage repair. *Am J Sports Med* 26, 309-324 (1998).
4. Becerra, J., *et al.* Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 617-627 (2010).
5. Cole, B.J., Pascual-Garrido, C. & Grumet, R.C. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *J Bone Joint Surg Am* 91, 1778-1790 (2009).
6. Redman, S.N., Oldfield, S.F. & Archer, C.W. Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 9, 23-32; discussion 23-32 (2005).
7. Caplan, A.I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S. & Goldberg, V.M. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, 254-269 (1997).
8. Steadman, J.R., Rodkey, W.G. & Rodrigo, J.J. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*, S362-369 (2001).
9. Steadman, J.R., Rodkey, W.G. & Briggs, K.K. Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg* 15, 170-176 (2002).
10. Kalson, N.S., Gikas, P.D. & Briggs, T.W. Current strategies for knee cartilage repair. *Int J Clin Pract* 64, 1444-1452 (2010).
11. Buckwalter, J.A. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 28, 192-202 (1998).
12. Minas, T. The role of cartilage repair techniques, including chondrocyte transplantation, in focal chondral knee damage. *Instr Course Lect* 48, 629-643 (1999).
13. Bouwmeester, S.J., Beckers, J.M., Kuijer, R., van der Linden, A.J. & Bulstra, S.K. Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop* 21, 313-317 (1997).

14. Buckwalter, J.A. & Mankin, H.J. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect 47, 487-504 (1998).
15. Hangody, L. & Fules, P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 2, 25-32 (2003).
16. Brittberg, M., *et al.* Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331, 889-895 (1994).
17. Minas, T. & Nehrer, S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. Orthopedics 20, 525-538 (1997).
18. Peterson, L., Brittberg, M., Kiviranta, I., Akerlund, E.L. & Lindahl, A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. Am J Sports Med 30, 2-12 (2002).
19. Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M. & Lindahl, A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 2, 17-24 (2003).
20. Brittberg, M., Peterson, L., Sjogren-Jansson, E., Tallheden, T. & Lindahl, A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 3, 109-115 (2003).
21. Knutsen, G., *et al.* Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. J Bone Joint Surg Am 86-A, 455-464 (2004).
22. Batty, L., Dance, S., Bajaj, S. & Cole, B.J. Autologous chondrocyte implantation: an overview of technique and outcomes. Anz J Surg 81, 18-25 (2011).
23. Farr, J., Cole, B., Dhawan, A., Kercher, J. & Sherman, S. Clinical cartilage restoration: evolution and overview. Clin Orthop Relat Res 469, 2696-2705 (2011).
24. Behrens, P., *et al.* [Indications and implementation of recommendations of the working group "Tissue Regeneration and Tissue Substitutes" for autologous chondrocyte transplantation (ACT)]. Z Orthop Ihre Grenzgeb 142, 529-539 (2004).
25. Marlovits, S., Zeller, P., Singer, P., Resinger, C. & Vecsei, V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. Eur J Radiol 57, 24-31 (2006).
26. Minas, T. & Peterson, L. Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. Clin Sports Med 18, 13-44, v-vi (1999).

27. Steinert, A.F., Nöth, U. & Tuan, R.S. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury* 39 Suppl 1, S97-113 (2008).
28. Steinert, A.F., *et al.* Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 9, 213 (2007).
29. Nehrer, S., Spector, M. & Minas, T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop Relat Res*, 149-162 (1999).
30. Wakitani, S., *et al.* Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant* 13, 595-600 (2004).
31. Kuroda, R., *et al.* Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 226-231 (2007).
32. Nejadnik, H., Hui, J.H., Feng Choong, E.P., Tai, B.C. & Lee, E.H. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* 38, 1110-1116 (2010).
33. 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* 469, 2706-2715 (2011).
34. Nestic, D., *et al.* Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 300-322 (2006).
35. Blunk, T., *et al.* Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* 8, 73-84 (2002).
36. Kellner, K., *et al.* Effects of hedgehog proteins on tissue engineering of cartilage in vitro. *Tissue Eng* 8, 561-572 (2002).
37. Pittenger, M.F., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).
38. Zhao, L.R., *et al.* Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174, 11-20 (2002).
39. Tuan, R.S., Boland, G. & Tuli, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 5, 32-45 (2003).
40. Chen, F.H., Rousche, K.T. & Tuan, R.S. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 373-382 (2006).
41. Caplan, A.I. & Bruder, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7, 259-264 (2001).

42. 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* 100 Suppl 1, 11917-11923 (2003).
43. Prockop, D.J., Sekiya, I. & Colter, D.C. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* 3, 393-396 (2001).
44. Alhadlaq, A. & Mao, J.J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 13, 436-448 (2004).
45. Nöth, U., *et al.* Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20, 1060-1069 (2002).
46. Xian, C.J. & Foster, B.K. Repair of injured articular and growth plate cartilage using mesenchymal stem cells and chondrogenic gene therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 1, 213-229 (2006).
47. Brochhausen, C., *et al.* Signalling molecules and growth factors for tissue engineering of cartilage-what can we learn from the growth plate? *J Tissue Eng Regen Med* 3, 416-429 (2009).
48. Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M. & Yoo, J.U. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238, 265-272 (1998).
49. Spagnoli, A., Longobardi, L. & O'Rear, L. Cartilage disorders: potential therapeutic use of mesenchymal stem cells. *Endocr Dev* 9, 17-30 (2005).
50. Worster, A.A., Nixon, A.J., Brower-Toland, B.D. & Williams, J. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 61, 1003-1010 (2000).
51. Worster, A.A., *et al.* Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res* 19, 738-749 (2001).
52. Horwitz, E.M., *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395 (2005).
53. Dominici, M., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317 (2006).
54. Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M. & Prockop, D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3213-3218 (2000).

55. Seo, S. & Na, K. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2011, 806891 (2011).
56. Freyria, A.M. & Mallein-Gerin, F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury* 43, 259-265 (2012).
57. Huang, J.I., *et al.* Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res* 23, 1383-1389 (2005).
58. Muraglia, A., Cancedda, R. & Quarto, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 ( Pt 7), 1161-1166 (2000).
59. Yoo, J.U., *et al.* The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 80, 1745-1757 (1998).
60. Nöth, U., Steinert, A.F. & Tuan, R.S. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, 371-380 (2008).
61. Majumdar, M.K., Banks, V., Peluso, D.P. & Morris, E.A. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 185, 98-106 (2000).
62. Sekiya, I., Vuoristo, J.T., Larson, B.L. & Prockop, D.J. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4397-4402 (2002).
63. Steinert, A.F., *et al.* Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res Ther* 11, R148 (2009).
64. Pelttari, K., *et al.* Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. *Arthritis Rheum* 54, 3254-3266 (2006).
65. Gelse, K., von der Mark, K., Aigner, T., Park, J. & Schneider, H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum* 48, 430-441 (2003).
66. Vortkamp, A., *et al.* Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-622 (1996).
67. Mackie, E.J., Tatarczuch, L. & Mirams, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol* 211, 109-121 (2011).

68. Goldring, M.B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97, 33-44 (2006).
69. Karsenty, G. & Wagner, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2, 389-406 (2002).
70. Palmer, G.D., *et al.* Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther* 12, 219-228 (2005).
71. Kronenberg, H.M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332-336 (2003).
72. van der Eerden, B.C.J., Karperien, M. & Wit, J.M. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocrine Reviews* 24, 782-801 (2003).
73. Szebenyi, G. & Fallon, J.F. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* 185, 45-106 (1999).
74. Ornitz, D.M. & Marie, P.J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16, 1446-1465 (2002).
75. Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M. & Vortkamp, A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3, 439-449 (2002).
76. Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J. & Efstratiadis, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73-82 (1993).
77. Fierro, F.A., Kalomoiris, S., Sondergaard, C.S. & Nolte, J.A. Effects on proliferation and differentiation of multipotent bone marrow stromal cells engineered to express growth factors for combined cell and gene therapy. *Stem Cells* 29, 1727-1737 (2011).
78. Toh, W.S., *et al.* Combined effects of TGFbeta1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. *Growth Factors* 23, 313-321 (2005).
79. Gelse, K., *et al.* Chondrogenic differentiation of growth factor-stimulated precursor cells in cartilage repair tissue is associated with increased HIF-1alpha activity. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 1457-1465 (2008).
80. Lee, K.H., *et al.* Regeneration of hyaline cartilage by cell-mediated gene therapy using transforming growth factor beta 1-producing fibroblasts. *Hum Gene Ther* 12, 1805-1813 (2001).
81. Shea, C.M., Edgar, C.M., Einhorn, T.A. & Gerstenfeld, L.C. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem* 90, 1112-1127 (2003).

82. Ahrens, M., *et al.* Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* 12, 871-880 (1993).
83. Carlberg, A.L., Pucci, B., Rallapalli, R., Tuan, R.S. & Hall, D.J. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* 67, 128-138 (2001).
84. Hanada, K., *et al.* BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem* 81, 284-294 (2001).
85. Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Reger, R.L. & Prockop, D.J. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 320, 269-276 (2005).
86. Hidaka, C., *et al.* Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 21, 573-583 (2003).
87. Park, J., *et al.* Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells. *J Gene Med* 8, 112-125 (2006).
88. Steinert, A., *et al.* Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* 21, 1090-1097 (2003).
89. Minina, E., *et al.* BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128, 4523-4534 (2001).
90. Serra, R., Karaplis, A. & Sohn, P. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation. *J Cell Biol* 145, 783-794 (1999).
91. Akiyama, H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol* 18, 213-219 (2008).
92. Eames, B.F., de la Fuente, L. & Helms, J.A. Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69, 93-101 (2003).
93. Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., Han, Y. & Pallavi, B. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 2195-2214 (2007).
94. Ingham, P.W. & McMahon, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15, 3059-3087 (2001).

95. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. & McMahon, A.P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13, 2072-2086 (1999).
96. Karp, S.J., *et al.* Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via Parathyroid Hormone related-Protein-dependent and -independent pathways. *Development* 127, 543-548 (2000).
97. Nusslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801 (1980).
98. Hammerschmidt, M., Brook, A. & McMahon, A.P. The world according to hedgehog. *Trends Genet* 13, 14-21 (1997).
99. Burglin, T.R. The Hedgehog protein family. *Genome Biol* 9, 241 (2008).
100. Panakova, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C. & Eaton, S. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 435, 58-65 (2005).
101. Beachy, P.A., *et al.* Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb Sym* 62, 191-204 (1997).
102. Porter, J.A., Young, K.E. & Beachy, P.A. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255-259 (1996).
103. Shum, L. & Nuckolls, G. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res* 4, 94-106 (2002).
104. Gelse, K., von der Mark, K. & Schneider, H. Cartilage regeneration by gene therapy. *Curr Gene Ther* 3, 305-317 (2003).
105. Evans, C.H., *et al.* Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther* 7, 1261-1280 (1996).
106. Evans, C.H., *et al.* Gene transfer to human joints: Progress toward a gene therapy of arthritis. *P Natl Acad Sci USA* 102, 8698-8703 (2005).
107. Madry, H. & Cucchiari, M. Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair. *Croat Med J* 52, 245-261 (2011).
108. Cucchiari, M. & Madry, H. Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* 7, 1495-1509 (2005).
109. Gelse, K. & Schneider, H. Ex vivo gene therapy approaches to cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 259-284 (2006).
110. Santos, J.L., *et al.* Non-viral gene delivery to mesenchymal stem cells: methods, strategies and application in bone tissue engineering and regeneration. *Curr Gene Ther* 11, 46-57 (2011).

111. Madry, H., *et al.* Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J Gene Med* 5, 502-509 (2003).
112. Thomas, C.E., Ehrhardt, A. & Kay, M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 4, 346-358 (2003).
113. Benihoud, K., Yeh, P. & Perricaudet, M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10, 440-447 (1999).
114. Empfehlungen des Robert Koch Institutes. Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe von rekombinantem Adenovirus Typ 5. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* 2002; 45:655-661.
115. Giacca, M. & Zacchigna, S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release* 161, 377-388 (2012).
116. Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M. & Caplan, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81-88 (1992).
117. Nöth, U., Tuli, R., Osyczka, A.M., Danielson, K.G. & Tuan, R.S. In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 8, 131-144 (2002).
118. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y. & Phipps, M.L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J Virol* 71, 1842-1849 (1997).
119. Sambrook J, R.D., *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. Vol. 1. 2001, New York: CSHL Press.
120. Weber, M., *et al.* Formation of cartilage matrix proteins by BMP-transfected murine mesenchymal stem cells encapsulated in a novel class of alginates. *Biomaterials* 23, 2003-2013 (2002).
121. Yanagishita, M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 43, 283-293 (1993).
122. Ding, D., *et al.* Over-expression of Sox2 in C3H10T1/2 cells inhibits osteoblast differentiation through Wnt and MAPK signalling pathways. *Int Orthop* 36, 1087-1094 (2012).
123. 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* 64, 67-76 (1999).

124. Zhang, L., *et al.* Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett* 32, 1339-1346 (2010).
125. Mueller, M.B. & Tuan, R.S. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 58, 1377-1388 (2008).
126. Kafienah, W., *et al.* Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum* 56, 177-187 (2007).
127. Holzapfel, B.M., *et al.* How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv Drug Deliv Rev* (2012).
128. Trippel, S.B., Ghivizzani, S.C. & Nixon, A.J. Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther* 11, 351-359 (2004).
129. Enomoto-Iwamoto, M., *et al.* Hedgehog proteins stimulate chondrogenic cell differentiation and cartilage formation. *J Bone Miner Res* 15, 1659-1668 (2000).
130. Steinert, A.F., *et al.* Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng Part A* 15, 1127-1139 (2009).
131. Kawamura, K., *et al.* Adenoviral-mediated transfer of TGF-beta1 but not IGF-1 induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet cultures. *Exp Hematol* 33, 865-872 (2005).
132. Karlsson, C., *et al.* Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *J Orthop Res* 25, 152-163 (2007).
133. Vortkamp, A. Interaction of growth factors regulating chondrocyte differentiation in the developing embryo. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A, S109-117 (2001).
134. Lanske, B., *et al.* PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273, 663-666 (1996).
135. Kronenberg, H.M. PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 1-13 (2006).
136. Chung, U.I., Schipani, E., McMahon, A.P. & Kronenberg, H.M. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest* 107, 295-304 (2001).
137. Wang, W., *et al.* Chondrocytic Atf4 regulates osteoblast differentiation and function via Ihh. *Development* 139, 601-611 (2012).

138. Chau, M., *et al.* Organization of the Indian hedgehog--parathyroid hormone-related protein system in the postnatal growth plate. *J Mol Endocrinol* 47, 99-107 (2011).
139. Maeda, Y., *et al.* Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone. *P Natl Acad Sci USA* 104, 6382-6387 (2007).
140. Plaisant, M., *et al.* Activation of hedgehog signaling inhibits osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 27, 703-713 (2009).
141. Wang, M., *et al.* Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1240, 61-69 (2011).
142. Mak, K.K., Chen, M.H., Day, T.F., Chuang, P.T. & Yang, Y. Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with *Ihh* signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* 133, 3695-3707 (2006).
143. Tavella, S., *et al.* Targeted expression of SHH affects chondrocyte differentiation, growth plate organization, and Sox9 expression. *J Bone Miner Res* 19, 1678-1688 (2004).
144. Wang, Y., *et al.* IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/*Ihh* pathway. *J Bone Miner Res* 26, 1437-1446 (2011).
145. Hsu, S.H., *et al.* *Kif7* promotes hedgehog signaling in growth plate chondrocytes by restricting the inhibitory function of *Sufu*. *Development* 138, 3791-3801 (2011).
146. Correa, D., *et al.* *Zfp521* is a target gene and key effector of parathyroid hormone-related peptide signaling in growth plate chondrocytes. *Dev Cell* 19, 533-546 (2010).
147. Wu, M., *et al.* *Zfp521* antagonizes *Runx2*, delays osteoblast differentiation *in vitro*, and promotes bone formation *in vivo*. *Bone* 44, 528-536 (2009).
148. Mwale, F., Stachura, D., Roughley, P. & Antoniou, J. Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res* 24, 1791-1798 (2006).
149. Muschler, G.F., Nitto, H., Boehm, C.A. & Easley, K.A. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 19, 117-125 (2001).
150. Shukunami, C., *et al.* Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 *in vitro*: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol* 133, 457-468 (1996).

151. Keller, B., *et al.* Interaction of TGFbeta and BMP signaling pathways during chondrogenesis. PLoS One 6, e16421 (2011).
152. Fischer, J., Dickhut, A., Rickert, M. & Richter, W. Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. Arthritis Rheum 62, 2696-2706 (2010).
153. Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E. & Richter, W. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Cell Physiol 223, 84-93 (2010).
154. Warzecha, J., *et al.* Sonic hedgehog protein promotes proliferation and chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. J Orthop Sci 11, 491-496 (2006).
155. Lee, K., *et al.* Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. Endocrinology 137, 5109-5118 (1996).
156. Grande, D.A., Mason, J., Light, E. & Dines, D. Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume 85A, 111-116 (2003).
157. Shen, B., *et al.* The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. J Cell Biochem 109, 406-416 (2010).

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Negativer IHH/PTHrP-Rückkopplungsmechanismus (nach Kronenberg, Developmental regulation of the growth plate)

**Abbildung 2:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von hMSC-Primärkulturen in Monolayer

**Abbildung 3:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von hMSC-Zellkulturen in Monolayer

**Abbildung 4:** IHH-Transgenexpression von hMSC-Pelletkulturen nach adenoviraler Transduktion im Zeitverlauf

**Abbildung 5:** TGF- $\beta$ 1-Transgenexpression von hMSC-Pelletkulturen nach adenoviraler Transduktion im Zeitverlauf

**Abbildung 6:** BMP-2-Transgenexpression von hMSC-Pelletkulturen nach adenoviraler Transduktion im Zeitverlauf

**Abbildung 7:** Fluoreszenzmikroskopie von hMSCs in Monolayer nach adenoviraler Transduktion mit IHH und SOX-9

**Abbildung 8:** Biochemische Analysen von hMSC-Aggregaten im Adenosintriphosphat-Assay nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 9:** DNA-Gehalt in hMSC-Pelletkulturen nach adenoviraler Transduktion

**Abbildung 10:** Glykosaminoglykan-Gehalt pro Pellet im Glykosaminoglykan-Assay

**Abbildung 11:** Glykosaminoglykan-Gehalt pro DNA im Glykosaminoglykan-Assay

**Abbildung 12:** Histologische Beurteilung der Chondrogenese von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100  $\mu\text{m}$ ) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50  $\mu\text{m}$ ) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 13:** Histologische Beurteilung der Chondrogenese von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100  $\mu\text{m}$ ) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50  $\mu\text{m}$ ) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 14:** Immunhistochemische Untersuchungen des Knorpelmatrixproteins Kollagen II von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100  $\mu\text{m}$ ) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50  $\mu\text{m}$ ) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 15:** Immunhistochemische Untersuchungen des Knorpelmatrixproteins Chondroitin-4-Sulfat von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100  $\mu\text{m}$ ) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50  $\mu\text{m}$ ) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 16:** Zeitverlauf der Genexpression knorpelspezifischer mRNA von hMSC-Pelletkulturen in der semiquantitativen und quantitativen RT-PCR nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder zusammen mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 17:** Biochemische Analysen von hMSC-Aggregaten im Alkalische Phosphatase-Assay nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF- $\beta$ 1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 18:** Histochemische Untersuchung der Hypertrophie von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 19:** Immunhistochemische Untersuchung der Hypertrophie von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 20:** Zeitverlauf der Genexpression hypertrophiespezifischer mRNA von hMSC-Pelletkulturen in der semiquantitativen und quantitativen RT-PCR nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder zusammen mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2

**Abbildung 21:** Untersuchung zur Zellvitalität und -apoptose von Zellpelletquerschnitten in 50- (Skalierungsbalken 100 µm) und 200-facher Vergrößerung (Skalierungsbalken 50 µm) nach adenoviralem Gentransfer von IHH allein oder in Kombination mit TGF-β1, SOX-9 oder BMP-2

## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe
- Tabelle 2:** Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangabe
- Tabelle 3:** Zellkulturmedien und -additive mit Herstellerangabe
- Tabelle 4:** Wirtszellen mit Herstellerangabe
- Tabelle 5:** Antikörper zur Charakterisierung des Phänotyps der hMSCs
- Tabelle 6:** Enzyme mit Herstellerangabe
- Tabelle 7:** Vektor-cDNA mit Herstellerangabe
- Tabelle 8:** Primersequenzen mit Anneal. Temp. (Annealing Temperatur), Produktgröße (bp, Basenpaare) und Zyklenzahl
- Tabelle 9:** Lösungen mit Inhaltsstoffen
- Tabelle 10:** Bausätze mit Herstellerangabe
- Tabelle 11:** verwendete Geräte mit Herstellerangabe
- Tabelle 12:** Software und Onlinedatenquellen

## Danksagung

Ich danke herzlich meinem wissenschaftlichen Lehrer, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andre Steinert, für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die Betreuung über all die Jahre, für das Korrekturlesen meiner Promotionsarbeit sowie die Förderung im klinischen Alltag.

Herrn Prof. Dr. med. Axel Rethwilm sei vielmals für die Übernahme des Korreferates gedankt.

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

Meinem Freund und Studienkollegen Gerhard Martin möchte ich für das Korrekturlesen sowie die gemeinsamen, langen Abende im Wissenschaftlichen Labor, die wir brüderlich durchgestanden haben, danken.

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

Ein großer, liebevoller Dank gilt meiner Freundin Manuela Kunz, die mich in die Techniken des wissenschaftlichen Arbeitens einführte, meine Versuche stets mitbetreute und mir immer ein hilfsbereiter Ansprechpartner war. Danke für deine Unterstützung sowie dein Verständnis, insbesondere in den letzten Wochen.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, ohne deren liebevolle Unterstützung so Vieles nicht möglich gewesen wäre. Ihr glaubt stets an mich und steht mir immer in meinem Leben zur Seite.