

**STAMMZELLBASIERTE
BEHANDLUNGSSTRATEGIEN ZUR
STIMMLIPPENAUUMENTATION UND
LARYNGEALEN DEFEKTRERKONSTRUKTION**



Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Dipl.-Ing. (FH) Mario Ramos Tirado
aus Frankfurt am Main

Würzburg, 2015

Eingereicht am: 11.06.2015

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Markus Engstler, Dekan der Fakultät für Biologie

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA

Gutachter: PD Dr. rer. nat. Robert Hock

Tag des Promotionskolloquiums: 29.07.2015

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1 EINLEITUNG 1

1.1 Funktionelle und strukturelle Läsionen des Kehlkopfs	1
1.1.1 Stimmlippenlähmungen und Substanzdefekte des Kehlkopfs	2
1.1.2 Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten von Stimmlippenlähmungen.....	2
1.1.3 Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten von Substanzdefekten des Kehlkopfs	4
1.1.4 Experimentelle zellbasierte Therapieansätze in der Laryngologie	5
1.2 Biomaterialien für die regenerative Medizin und das Tissue Engineering	6
1.2.1 Definition von mesenchymalen Stammzellen	6
1.2.2 Definition von Fettgewebstammzellen	7
1.2.3 Synthetische Trägermaterialien.....	8
1.2.4 Hydrogele aus natürlichen Trägermaterialien	10
1.3 Zellmarkierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln	11
1.4 Ziele der Arbeit.....	13

2 MATERIAL UND METHODEN 14

2.1 Isolierung, Expansion und Phänotypisierung von Fettgewebstammzellen..	14
2.1.1 Spender und Spendertiere.....	14
2.1.2 Isolierung, Expansion und Kryokonservierung.....	15
2.1.3 Phänotypisierung	18
2.2 Multidifferenzierungspotential von Fettgewebstammzellen zu phänotypähnlichen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen.....	20
2.2.1 Induktion der Differenzierung	21
2.2.2 Histologischer Nachweis der Differenzierung.....	22
2.2.3 Biochemischer Nachweis der Differenzierung.....	26
2.2.4 Bestimmung der Expression gewebespezifischer Markergene	28
2.3 Chondrogene Differenzierung von Fettgewebstammzellen in Hydrogelen ..	34
2.3.1 Herstellung und Besiedelung von Hydrogelen.....	35

2.3.2	Induktion der chondrogenen Differenzierung	37
2.3.3	Nachweis der chondrogenen Differenzierung	37
2.4	Untersuchung zellbesiedelter Hydrogele im <i>in vitro</i>- und im <i>in vivo</i>-Knorpeldefektmodell	40
2.4.1	<i>In vitro</i> -Knorpeldefektmodell	40
2.4.2	<i>In vivo</i> -Knorpeldefektmodell	42
2.5	Einfluss der Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Biologie und Physiologie von Fettgewebstammzellen	45
2.5.1	Markierung von Fettgewebstammzellen	46
2.5.2	Proliferation, Migration und Koloniebildung	47
2.5.3	Multidifferenzierungspotential.....	49
2.5.4	Vitalität und genomische Stabilität.....	49
2.5.5	Genexpression von Entzündungs-, Angiogenese- und Apoptosemarkern	57
2.6	Detektion von Fettgewebstammzellen nach der Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln.....	58
2.6.1	Berlinerblau-Färbung	58
2.6.2	Transmissionselektronenmikroskopie	60
2.6.3	Magnetresonanztomographie	60
2.7	Graphische Darstellung und statistische Auswertung	62

3 ERGEBNISSE **64**

3.1	Phänotypische Eigenschaften von Fettgewebstammzellen	64
3.2	Multidifferenzierungspotential von Fettgewebstammzellen zu phänotypähnlichen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen.....	65
3.2.1	Histologischer Nachweis der Differenzierung.....	65
3.2.2	Biochemischer Nachweis der Differenzierung.....	66
3.2.3	Expression gewebespezifischer Markergene.....	66
3.3	Chondrogene Differenzierung von Fettgewebstammzellen in Hydrogelen ..	67
3.3.1	Anreicherung von extrazellulären Knorpelmatrixproteinen.....	68
3.3.2	Quantitativer Nachweis von Knorpelmatrixproteinen	74
3.3.3	Expression knorpelspezifischer Markergene	76

3.4	Verhalten von zellbesiedelten Hydrogelen im <i>in vitro</i>- und im <i>in vivo</i>-Knorpeldefektmodell	82
3.4.1	<i>In vitro</i> -Knorpeldefektmodell mit vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten.....	82
3.4.2	<i>In vitro</i> -Knorpeldefektmodell mit nicht-vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten	84
3.4.3	<i>In vivo</i> -Knorpeldefektmodell mit vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten.....	86
3.5	Einfluss der Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Biologie und Physiologie von Fettgewebstammzellen	88
3.5.1	Proliferation, Migration und Koloniebildung	88
3.5.2	Multidifferenzierungspotential.....	90
3.5.3	Vitalität und genomische Stabilität.....	94
3.5.4	Genexpression von Entzündungs-, Angiogenese- und Apoptosemarkern	100
3.6	Detektion von Fettgewebstammzellen nach der Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln	101
3.6.1	Berlinerblau-Färbung	101
3.6.2	Transmissionselektronenmikroskopie	103
3.6.3	Magnetresonanztomographie	103
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	105

4 DISKUSSION 107

4.1	Sind Fettgewebstammzellen für den therapeutischen Einsatz in der regenerativen Medizin geeignet?	107
4.2	Agarosehaltige Hydrogele weisen bezüglich ihrer Materialeigenschaften und der Zellverteilung als Trägermaterialien für Knorpelersatzgewebe überwiegend Nachteile auf	109
4.3	Führt die Kombination von Wachstumsfaktoren zu einer Verstärkung der chondrogenen Differenzierung von Fettgewebstammzellen?	112
4.4	Die extrazelluläre Matrixsekretion und knorpelspezifische Genexpression wird auch von den Trägermaterialien beeinflusst	115
4.5	Was sagt das Verhalten differenzierter Zell-Hydrogelkonstrukte in den Knorpeldefektmodellen über eine mögliche klinische Anwendbarkeit aus? 117	

4.6	Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel können wegen genotoxischer Effekte auf Fettgewebstammzellen nur begrenzt als Zellmarker verwendet werden	120
4.7	Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel signalisieren durch eine eingeschränkte Nachweisbarkeit markierter Fettgewebstammzellen im Larynx die Notwendigkeit von alternativen Detektionsverfahren.....	122
4.8	Ausblick.....	125

5 ZUSAMMENFASSUNG 128

6 SUMMARY 130

7 ANHANG 132

7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	132
7.2	Literaturverzeichnis	133
7.3	Kongressbeiträge aus der vorliegenden Arbeit.....	154
7.4	Curriculum Vitae	155
7.5	Danksagung	156
7.6	Eidesstattliche Erklärung	158

1 EINLEITUNG

Der Kehlkopf ist ein stimmerzeugendes Organ und spielt eine wichtige Rolle in der Atemfunktion und beim aspirationsfreien Schluckakt. Teilresektionen oder komplette Kehlkopfresektionen nach Tumoren, Traumata sowie Nervenschädigungen führen zu Substanzdefekten des Kehlkopfes und zum Verlust seiner Funktionen. Zur Behandlung sind daher individuelle Rehabilitationskonzepte erforderlich. Die hierfür notwendigen und oftmals komplexen Rekonstruktionen können jedoch nur bedingt durch körpereigenes Ersatzgewebe bewerkstelligt werden. Kann dieses Problem mit der Hilfe des Tissue Engineerings gelöst werden?

Unsere Arbeitsgruppe Experimentelle Laryngologie an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg beschäftigt sich mit der Generierung von funktionsfähigem Knorpelgewebe zur Behandlung von gelähmten Stimmlippen und Rekonstruktion von Kehlkopfdefekten. Die vorliegende Arbeit soll einen Überblick über Strategien geben, wie körpereigene Stammzellen aus Fettgewebe außerhalb des Körpers vermehrt und eingebettet in Biopolymeren angeregt werden können, um Knorpelgewebe neu aufzubauen. Die Möglichkeit solche funktionsfähigen Knorpelersatzgewebe in injizierbaren Suspensionen sowie in justierbaren und festen Formen in die betroffenen Patienten einzubringen, würde in der Behandlung von Stimmlippenlähmungen und Rekonstruktion von Kehlkopfdefekten einen therapeutischen Fortschritt bedeuten.

1.1 Funktionelle und strukturelle Läsionen des Kehlkopfs

Das Skelett des Kehlkopfes besteht aus hyalinem und elastischem Knorpelgewebe, das im Laufe der Alterung zunehmend verknöchert. Der Kehlkopf schützt durch den Verschluss mit dem Kehldeckel die unteren Atemwege vor der Aspiration von Speise und Flüssigkeiten während des Schluckvorgangs. Ebenso reguliert er durch die Erweiterung und Verengung der Stimmritze sowie durch die Anspannung der Stimmlippen den Atemluftstrom. Die dabei entstehenden Schwingungen der Stimmlippen erzeugen den Grundton der Stimme (Sasaki & Isaacson, 1988; Reiter et al., 2014). Motorisch werden die hierfür beteiligten Kehlkopfmuskeln vor allem durch den rückläufigen Kehlkopfnerve (*Nervus laryngeus recurrens*) versorgt (Schiebler & Schmidt, 1997). Funktionelle und strukturelle Läsionen des Kehlkopfes wie z. B. Stimmlippenlähmungen und Substanzdefekte des Kehlkopfes haben die Beeinträchtigung von Stimme, Schlucken und Atmung zur Folge und stellen für die betroffenen Patienten eine Verminderung der Lebensqualität dar.

1.1.1 Stimmlippenlähmungen und Substanzdefekte des Kehlkopfs

Die Ursachen von Stimmlippenlähmungen und Substanzdefekten des Kehlkopfs sind sehr vielfältig. Stimmlippenlähmungen können durch endokranielle und entzündliche Erkrankungen wie z. B. Schädel-Hirntraumata bzw. Enzephalitis (Reiter et al., 2014) hervorgerufen werden. Ebenso sind Schädigungen des Kehlkopfnerfs nach operativen Eingriffen wie z. B. Thyroidektomien oder Tumorresektionen (Steurer et al., 2002; Takano et al., 2012) möglich. Diese können temporär oder dauerhaft sein sowie einseitig und beidseitig auftreten. Solche Lähmungen manifestieren sich durch Minderbeweglichkeit der Stimmlippen oder einen kompletten Stimmlippenstillstand in Kombination mit einer Fehlstellung der Stimmlippen. Dadurch leiden die betroffenen Patienten an Heiserkeit, gegebenenfalls an Atemnot sowie an einer Schluckstörung (Nawka & Wirth, 2008; Brunner et al., 2011; Reiter et al., 2014).

Substanzdefekte des Kehlkopfs entstehen z. B. bei der Behandlung von Tumoren durch Teilresektionen des Kehlkopfs oder eine totale Kehlkopfentfernung. Die Entfernung oder der Verlust von funktionellen Bestandteilen des Kehlkopfs bringen Funktionsverluste mit sich (Lorenz, 2014). Während bei Teilresektionen des Kehlkopfs eingeschränkt funktionsfähige Reste erhalten werden können, ist dies bei der kompletten Kehlkopfentfernung nicht der Fall (Knecht & Baghi, 2009). Für die Betroffenen hat dies den Verlust der Stimme, Atemkonditionierung und des Riechens zur Folge (Lorenz, 2014). Auch Verletzungen am Hals können Ursache von Substanzdefekten des Kehlkopfs sein (Mohan et al., 2009). Die möglichen Folgen sind Frakturen und Dislokationen des Kehlkopfknorpels. Darüber hinaus kann eine Durchtrennung und Eröffnung der Atemwege von außen im Langzeitverlauf zu Stenosen führen (Lenarz & Boenninghaus, 2012). Bei solchen Traumen kann die Innervation direkt am Kehlkopf oder innerhalb des Kehlkopfs betroffen sein (Knecht & Baghi, 2009).

1.1.2 Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten von Stimmlippenlähmungen

Um bei einer Stimmlippenlähmung oder nach Teilresektion der Stimmlippe einen Stimmlippenschluss für die Phonation oder den Aufbau des Hustenstoßes zu erreichen, gibt es grundsätzlich 3 verschiedene Ansätze: Augmentation und Medialisierung der Stimmlippe sowie Rotation des Stellknorpels. Bei der Stimmlippenaugmentation kommt es durch den Volumenaufbau zur Medialisierung der Stimmlippe und somit zu einer Verbesserung des Glottisschlusses (Sittel & Plinkert, 2005). Dieses Verfahren wurde erstmals 1911 von Brünings unter der Verwendung von Paraffin zur Behandlung gelähmter Stimmlippen beschrieben (Brünings, 1911). In den 1960er Jahren wurde dieses Verfahren wieder aufgenommen und durch die Verwendung von Endoskopen und

unterschiedlichen resorbierbaren und nicht-resorbierbaren Implantationsmaterialien weiterentwickelt. Bei der Verwendung von nicht-resorbierbaren Materialien zeigte das zwischen 1960 und 1980 am häufigsten verwendete Teflon negative Eigenschaften wie eine schlechte Toleranz, Fremdkörperreaktionen und Verteilung auf andere Organe (Arnold, 1963; Dedo et al., 1973; Dedo & Carlsöö, 1982) sowie Granulombildungen (Pagedar et al., 2009). Derzeit erlaubt das gut verträgliche Polydimethylsiloxan eine langfristige Stimmlippenaugmentation (Sittel, 2004; Sittel & Plinkert, 2005; Sittel et al., 2006; Bergamini et al., 2010). Als resorbierbare Materialien zur temporären Stimmlippenaugmentation fanden bereits Gelatine (Arnold & Laskawi, 1986; Halum et al., 2005), autologes Fett (Brandenburg et al., 1992; Laccourreye et al., 2009), Hyaluronsäure (Segura et al., 2005; Molteni et al., 2010) und bovines Kollagen (Ford & Bless, 1986, Moonis et al., 2005; Remacle et al., 2007) Anwendung, wobei letzteres heute nicht mehr verwendet wird. Eine permanente und stabile Stimmlippenaugmentation mit biokompatiblen Materialien ist bis heute nicht möglich.

Bei einer Medialisierung von außen, auch Thyroplastik genannt, wird die gelähmte Stimmlippe mit Fehlstellung über einen Zugang von außen zur Mitte der Glottisebene hin verlagert und dabei gestrafft, um einen Glottisschluss zu erzielen. Hierfür wird von außen im Schildknorpel ein Fenster angelegt, in das ein Implantat eingebracht und anschließend fixiert wird. Ein solches Verfahren wurde erstmals 1915 von Payr beschrieben (Payr, 1915), 1974 von Isshiki et al. wieder aufgenommen (Isshiki et al., 1974), weiter modifiziert (Isshiki et al., 1989) und ist als Thyroplastik Typ I bekannt. Während Isshiki und Mitarbeiter zunächst Silikonblöcke (Isshiki et al., 1974, 1975) als Implantate verwendeten, haben sich später Implantate aus Hydroxylapatit (Cummings et al., 1993; Carroll & Rosen, 2011) und Titan (Friedrich, 1998a, b, 1999) durchgesetzt. Auch körpereigener Knorpel wird hierfür verwendet (Voigt-Zimmermann & Arens, 2013). So beschrieben Kleinsasser et al. (1982) die Verwendung von Knorpelstücken bei der sogenannten Türflügelthyroplastik. Ergänzend zur Thyroplastik Typ I kann durch eine Rotation des Stellknorpels eine Medialisierung des dorsalen Stimmlippenanteils erzielt werden. Nach Freilegen des Stellknorpels durch ein Fenster im Schildknorpel wird der Muskel-Fortsatz am Vokal-Fortsatz nach medial verlagert (Sittel et al., 2008; Knecht & Baghi, 2009).

Während endogene Materialien mit Problemen hinsichtlich einer Resorption (McCulloch et al., 2002; Karpenko et al., 2003; Sittel & Plinkert, 2005) konfrontiert werden und keine langfristig zufriedenstellenden Resultate garantieren, zeigen synthetische Materialien negative Eigenschaften wie Extrusionen und Infektionen (Baijens et al., 2007). Diese Probleme führen nicht nur zu einem Wiederauftreten der ursprünglichen Symptome, sondern können zusätzlich, im Fall einer Extrusion des eingebrachten Materials nach endolaryngeal, zu einer Beeinträchtigung der Atemwege führen (Halum et al., 2005).

1.1.3 Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten von Substanzdefekten des Kehlkopfs

Tieferegreifende Substanzdefekte des Kehlkopfs bedingt durch Verletzungen erfordern zunächst eine genaue laryngoskopische Untersuchung, wofür sich die Mikrolaryngoskopie besonders empfiehlt (Kleinsasser, 1991; Kleinsasser et al., 2000). Nach Sicherung der Atemwege erfolgt die Rekonstruktion des Kehlkopfskeletts und der intralaryngealen Schleimhaut endoskopisch oder von außen (Seidl et al., 2008). Die Vorgehensweise ist dann vom Grad und Ausmaß der Schädigung abhängig. Prinzipiell wird so viel wie möglich vom noch vorhandenen Gewebe für die Wiederherstellung verwendet. Für die Rekonstruktion des Kehlkopfskeletts können Knorpelfragmente z. B. mit Nähten, Drähten oder Titanplatten adaptiert werden (Maier et al., 2011). Ebenso können hierfür resorbierbare Platten und Stifte (Kleinsasser et al., 2005) sowie autologer Rippenknorpel (Siegert et al., 2002) verwendet werden. Zur Stabilisierung des Kehlkopfskeletts können bei Rekonstruktionen zusätzlich laryngeale Platzhalter aus Silikon (Montgomery & Montgomery, 1990) am Gewebe fixiert werden.

Bei Substanzdefekten des Kehlkopfs nach Tumorsektionen ist das chirurgische Vorgehen ebenfalls vom Umfang der Resektion und vom noch vorhandenen, funktionellen Gewebe abhängig. Kehlkopfrekonstruktionen stellen bis heute eine große Herausforderung dar. Sind nur Teile der Stimmlippe betroffen, so kann beispielsweise autologe Wangenschleimhaut für die Rekonstruktion und Auffüllung verwendet werden (Isshiki, 2000). Dafür bieten sich auch Muskel- oder Schleimhautlappen aus den umliegenden Regionen des Kehlkopfs an (Arens, 2010), wie z. B. die Taschenfalten (Ambrosch & Fazel, 2011). Regionale Knochen-Muskellappen aus der geraden Halsmuskulatur und dem Zungenbein wurden von Cansiz et al. (2004) zur Kehlkopfrekonstruktion eingesetzt. Ebenso wurden hierfür Trachealsegmente mit erhaltener Schleimhautauskleidung verwendet (Delaere & Hermans 2003; Delaere et al., 2003). Auch dreidimensionale Konstrukte aus Hautlappen, welche zusätzlich mit autologem Knochen oder Knorpel (Rohner et al., 2002) sowie mit Titan oder resorbierbaren Materialien stabilisiert werden können (Schipper et al., 2006), wurden zum Zweck der Kehlkopfrekonstruktion eingesetzt. Andere Ansätze basieren auf Reinnervationstechniken am Kehlkopf zur Wiederherstellung von Sensibilität, Glottisschluss, Glottisöffnung und Stimmlippenspannung (Paniello, 2004). Darüber hinaus wurden Fälle publiziert, in denen Kehlkopfgerüste implantiert (Huber et al., 2003) oder sogar komplette Kehlköpfe transplantiert wurden (Strome, 2000; Strome et al., 2001; Tintinago et al., 2004; Farwell et al., 2013). Bei diesen chirurgischen Verfahren variieren die Resultate von zufriedenstellend bis unbefriedigend.

1.1.4 Experimentelle zellbasierte Therapieansätze in der Laryngologie

Die häufig auftretenden Komplikationen, Spätfolgen und nicht immer zufriedenstellenden Resultate der traditionellen chirurgischen Verfahren zur Stimmlippenaugmentation und Kehlkopfrekonstruktion verstärkten die Suche nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten. Eine dieser neuen Möglichkeiten basiert auf dem Prinzip körpereigene Zellen vom Patienten zu entnehmen und diese im Labor zur Züchtung von Ersatzgewebe zu vermehren. Die generierten Ersatzgewebe oder auch nur die Zellen können dann wieder in den gleichen Patienten zur Reparatur oder Deckung von Defekten implantiert bzw. injiziert werden (Caplan, 2007).

Es gibt unterschiedliche Ansätze zur zellbasierten Behandlung von Stimmlippenlähmungen oder laryngealen Defekten unter der Verwendung unterschiedlicher Zelltypen. So wurde zur Rekonstruktion der Oberfläche einer vernarbten Stimmlippe ein zweischichtiges Konstrukt aus körpereigenen Fettgewebstammzellen und Trägermaterial generiert (Long et al., 2010). Bei der Untersuchung der Vernarbung von Stimmlippen in Tierversuchen verwendeten Chhetri et al. (2004) kultivierte Fibroblasten. Kumai et al. (2010) setzten hierfür Co-Kulturen aus Fibroblasten und Fettgewebstammzellen ein, um eine mögliche Verbesserung der Stimmlippenvernarbung zu analysieren. Ebenso wurde die Behandlung von Stimmlippenvernarbungen mit Präadipozyten (Glatz et al., 2003) und mesenchymalen Stammzellen (Hertegard et al., 2006) in Kaninchen untersucht. Von Halum et al. (2007) wurden Stimmlippenlähmungen mit Muskelstammzellen in Ratten behandelt. Ebenso wurden verschiedene Hydrogele als Zellträger in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen zur Augmentation (Park et al., 2010) und Regeneration (Kanemaru et al., 2003, 2005; Lee et al., 2006; Johnson et al., 2010) von Stimmlippen untersucht. Auch wenn die bisherigen Ergebnisse dieser Untersuchungen und Anwendungen teilweise vielversprechend sind, so fanden diese bislang keine klinische Anwendung. Somit steht die Entwicklung zellbasierter, injizierbarer Füllmaterialien zur Stimmlippenaugmentation weiterhin im Fokus der experimentellen Laryngologie. Ebenso ist die Generierung stabiler Knorpelersatzgewebe zur Verwendung als Implantate für die Stimmlippenmedialisierung von außen und die Kehlkopfrekonstruktion von hoher klinischer Relevanz. Knorpel, ein sich schlecht regenerierendes Gewebe (Grande, 1999), welches nur in begrenzten Mengen zur Verfügung steht, ist eines der wichtigsten Zielgewebe für das Tissue Engineering geworden.

1.2 Biomaterialien für die regenerative Medizin und das Tissue Engineering

Die meisten Säugetierzellen sind verankerungsabhängig und benötigen ein geeignetes Gerüst oder Trägermaterial. Letztere sollen einen Raum füllen, der normalerweise von natürlichem Gewebe besetzt war und eine Grundstruktur für die Geweberegeneration und die Bildung von neuem Gewebe bietet. Das Prinzip des Tissue Engineerings besteht darin, Zellen aus einem Patienten zu entnehmen und diese im Labor zu vermehren. Das Ziel ist, aus diesen Zellen ein funktionelles Ersatzgewebe in Kombination mit Trägermaterialien zu generieren, welches dem Patienten, von dem die Zellen stammen, zur Geweberegeneration und Defektdeckung implantiert werden kann (Borges et al., 2003). Mesenchymale Stammzellen können unter bestimmten Bedingungen wie unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren chondrogen differenzieren und extrazelluläre Knorpelmatrix produzieren (Guilak et al., 2004; Bunnell et al., 2008). In dreidimensionalen Zellkulturen und in Trägermaterialien konnte dies bereits erfolgreich durchgeführt werden (Silverman et al., 2000; Awad et al., 2004; Li et al., 2005). Damit diese Ansätze des Tissue Engineerings, wie z. B. autologe Implantate für die Stimmlippenmedialisierung oder die Rekonstruktion des Kehlkopfskeletts Anwendung in der Laryngologie finden, müssen bestimmte Kriterien erfüllt sein. Mechanische Eigenschaften wie Festigkeit, Beständigkeit und Flexibilität sind für eine optimale Implantation in den Patienten notwendig (Fedorovich et al., 2007; Balakrishnan & Banerjee, 2011). Des Weiteren ist auch eine homogene, dreidimensionale Zellverteilung im Konstrukt erforderlich, um eine ausreichende chondrogene Differenzierung zu gewährleisten (Grad et al., 2003a; Lee et al., 2005).

1.2.1 Definition von mesenchymalen Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren können. Mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells, MSC) stammen ursprünglich aus dem Mesenchym, einem Gewebe in der frühen Entwicklungsphase des Embryos, aus dem verschiedene Arten von Bindegewebe und hämatopoetische Gewebe hervorgehen.

Die Existenz fibroblastenartiger, nicht-hämatopoetischer Zellen im Knochenmark, welche offenbar an der Regeneration entzündeter Gewebe beteiligt sind, wurde 1867 von Cohnheim beschrieben (Cohnheim, 1867). Der Gründer des Konzepts der mesenchymalen Stammzellen war jedoch Friedenstein (Afanasyev et al., 2009), der in den späten 1960er Jahren plastikadhärente, mesenchymale Vorläuferzellen mit einem osteogenen Differenzierungspotential aus Knochenmark isolierte (Friedenstein et al., 1966, 1968). Später haben sich dann die Bezeichnungen mesenchymale Stromazellen

(Owen, 1988) und mesenchymale Stammzellen (Caplan, 1991) für diese Zellen durchgesetzt. Neben Knochenmark (Prockop, 1997; Pittenger, 1999) konnten adulte mesenchymale Stammzellen dann auch aus weiteren Geweben wie z. B. Fettgewebe (Zuk et al., 2001; Strem et al., 2005; Hoogduijn et al., 2007), Synovialmembran (Yoshimura et al., 2007), Periost (Nakahara et al., 1991), Muskelgewebe (Bosch et al., 2000) und Zahnpulpa (Gronthos et al., 2002) isoliert werden. Zur einheitlichen Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen wurden von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (International Society for Cellular Therapy, ISCT) folgende Minimalkriterien definiert (Dominici et al., 2006):

- die Zellen adhären unter Standardkulturbedingungen an Plastik
- die Zellen exprimieren die spezifischen Oberflächenmarkerproteine CD73, CD90, und CD105, während CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD79 oder CD19 und HLA-DR nicht exprimiert werden
- die Zellen besitzen die Fähigkeit *in vitro* in Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren, was mittels spezifischer histologischer Färbungen nachweisbar ist

In der regenerativen Medizin werden mesenchymale Stammzellen sowohl in der Forschung als auch im Rahmen klinischer Anwendungen eingesetzt (Gimble et al., 2010; Casteilla et al., 2011; Gir et al., 2012). Als Grundlage für zellbasierte Therapieoptionen hierfür gelten ihre immunmodulatorische (Le Blanc et al., 2004) und wundheilungsfördernde Wirkung (Sung et al., 2012) sowie deren Multidifferenzierungspotential (Pittenger et al., 1999; Zuk et al., 2001; Gimble et al., 2008). In den Focus der Untersuchungen rückten in den letzten Jahren zunehmend adulte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark als Zellquelle für das Tissue Engineering (Yan & Yu, 2007; Dickhut et al., 2008; Wang et al., 2009; Tian et al., 2010). Die Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark ist jedoch mit invasiven Methoden verbunden, welche Schmerzen und Komplikationen mit sich bringen können (Lee et al., 2006).

1.2.2 Definition von Fettgewebstammzellen

Zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigen sich seit dem Jahr 2000 mit der Isolierung von adulten mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe, auch Fettgewebstammzellen genannt. Im Vergleich zu Knochenmark ist Fettgewebe leichter zu erreichen, in größeren Mengen verfügbar und dessen Gewinnung mit weniger Unannehmlichkeiten für die Betroffenen verbunden (Gimble, 2003; Gimble & Guilak, 2003; Bray, 2004; Kuhbier et al.,

2010; Wilson et al., 2011; Roemeling-van Rhijn et al., 2012). Ebenso ist die Ausbeute an mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe deutlich höher als die aus Knochenmark (Strem et al., 2005; Mitchell et al., 2006).

Die Isolierung von reifen Adipozyten unter der Verwendung des Enzyms Kollagenase reicht bis in das Jahr 1964 zurück (Rodbell, 1964). Im darauffolgenden Jahrzehnt wurden dann Vorläuferzellen im Fettgewebe identifiziert, die in reife Adipozyten differenzieren können (Van & Roncari, 1977). Diese sogenannten Vorläuferzellen wurden 1985 von Pettersson und Mitarbeitern der Stromalen, vaskulären Fraktion (SVF) zugeordnet (Pettersson et al., 1985). Schließlich wurde die Anwesenheit von multipotenten Stammzellen im Fettgewebstroma nachgewiesen (Zuk et al., 2001, 2002). Nach dem Prinzip von Rodbell (1964) erhält man die SVF nach dem Kollagenaseverdau von Fettgewebe und mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten. Durch Kultivierung der SVF, eine heterogene Mischung unterschiedlicher Zellen, werden aus dieser die plastikadhärenten Fettgewebstammzellen (adipose tissue-derived stromal cells, ASC) selektiert (Bunnell et al., 2008; Bourin et al., 2013). Diese Zellen erfüllen die Minimalkriterien für mesenchymale Stammzellen der ISCT (Dominici et al., 2006) und sind somit multipotent (Zuk et al., 2001, 2002; Strem et al., 2005; Bunnell et al., 2008; Gimble et al., 2008), plastikadhärent (Jiang et al., 2002; Katz et al., 2005; Levi & Longaker, 2011) und zeigen die Expression der spezifischen Oberflächenmarkerproteine (Dicker et al., 2005; Kern et al., 2006; Mitchell et al., 2006; Tapp et al., 2009). Diese Minimalkriterien für MSC (Dominici et al., 2006) wurden kürzlich von der ISCT durch die Definition von Minimalkriterien für die SVF und ASC ergänzt (Bourin et al., 2013). Demnach entwickeln expandierte ASC eine typische spindelförmige und fibroblastenartige Morphologie und exprimieren die Oberflächenmarkerproteine CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105, während CD31, CD45 und CD235a nicht exprimiert werden. Für deren Nachweis wird die Durchflusszytometrie empfohlen. Des Weiteren wird bei der Untersuchung des Multidifferenzierungspotentials von ASC neben dem histologischen Nachweis auch ein molekularbiologischer Nachweis, die Expression gewebespezifischer Markergene mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR), zur Charakterisierung von ASC vorgeschlagen (Bourin et al., 2013).

1.2.3 Synthetische Trägermaterialien

Eine Vielzahl von synthetischen und natürlichen Materialien können als Zell-Trägermaterialien für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe verwendet werden. Synthetische Materialien bieten den Vorteil, dass deren Eigenschaften einfacher modifiziert und kontrolliert werden können, als bei natürlichen Materialien (Raghunath et al., 2007). Ein ideales Trägermaterial soll Adhäsion, Wachstum und Differenzierung der

Zellen erleichtern sowie die Bildung und Organisation von neuem Gewebe unterstützen (Tapp et al., 2009).

Vertreter synthetischer, organischer Trägermaterialien sind Polyhydroxysäuren wie z. B. Polylactid (PLA), Polyglykolsäure (PGA), Polycarbolacton (PCL) und deren Copolymere. Diese haben in der Form von degradierbaren Schwämmen zur Generierung von Knorpelgewebe bereits Anwendung gefunden und zu zufriedenstellenden Resultaten geführt (Honda et al., 2000; Shieh et al., 2004; Li et al., 2005; Raghunath et al., 2007). Diese Materialien unterstützen die Zelladhäsion und Proliferation (Grande et al., 1997; Gugala & Gogolewski, 2000). PGA induziert die Bildung von hyalinem Knorpel (Ossendorf et al., 2007) und wird zu nicht-toxischen Stoffwechselprodukten degradiert (Anthanasiou et al., 2001). Die Nachteile der Polyhydroxysäuren sind, dass diese nicht deformierbar, nicht belastbar und unelastisch sind (Grad et al., 2003b). Des Weiteren können diese synthetischen Materialien nicht injiziert werden (Vinatier et al., 2009). Polyurethan ist ein PCL-basiertes synthetisches, organisches Trägermaterial, welches für die Generierung von Knorpelersatzgewebe verwendet werden kann. Dieses wurde für diesen Zweck auch in unserer Arbeitsgruppe untersucht (Froelich et al., 2012). Dessen Adhäsionsbedingungen für die Zellen sind mit denen von natürlichen Materialien vergleichbar (Grad et al., 2003a). Trägermaterialien mit größeren Poren sind in Kombination mit Hydrogelen jedoch oftmals schlecht mit Zellen besiedelbar und zeigen eine inhomogene Zellverteilung, woraus dann eine inhomogene Extrazellulärmatrix-Anreicherung und -Aufrechterhaltung resultiert (Lee et al., 2005; Eyrich et al., 2007a, b).

Weitere synthetische, organische Materialien umfassen Polyethylenoxid (PEO), Polyvinylalkohol (PVA), Polyacrylsäure (PAA) und Polypropylen-Fumarat (PPF). Diese Materialien werden überwiegend in der Form von Hydrogelen verwendet (Varghese & Elisseff, 2006) und ausgiebige Untersuchungen zeigten, dass diese die Chondrogenese unterstützen (Bryant & Anseth, 2002; Williams et al., 2003). Trägermaterialien aus Polyethylenglykol (PEG), ein Oligomer des PEO, wurde in den USA von der Food and Drug Administration (FDA) zur humanen Anwendung zugelassen. Dieses ist biokompatibel und hydrophil, verhindert jedoch die Bindung von Proteinen und Zellen (Peppas et al., 2000) und wird häufig mit anderen Materialien copolymerisiert (Kim et al., 2000). Dies ermöglicht eine Verbesserung der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in PEG-Hydrogelen (Varghese et al., 2008). Synthetische anorganische Trägermaterialien werden kaum zur Generierung von Knorpelgewebe verwendet, da die gesunde Knorpelmatrix keine kristallinen, anorganischen Komponenten enthält (Meyer & Wiesmann, 2006).

1.2.4 Hydrogele aus natürlichen Trägermaterialien

Hydrogele bestehen aus dreidimensionalen Netzwerken hydrophiler Polymer- oder Polysaccharidketten, bei denen Wasser den Hauptanteil bildet und zugleich als Dispersionsmedium fungiert. Deren Trockenmasse variiert zwischen 0,5% und 20% bezogen auf die Gesamtmasse (Ho et al., 2010). Aufgrund ihres hohen Wassergehalts besitzen Hydrogele auch eine hohe Flexibilität, die der von natürlichem Gewebe ähnelt. Ebenso kann durch die Beeinflussung der Gelfestigkeit Implantaten eine mechanische Integrität verliehen werden (Shoichet et al., 1996). Hydrogele aus natürlichen Polymeren und Polysacchariden haben eine ähnliche makromolekulare Struktur wie Knorpel. Letzteres ist ein stark hydratisiertes Gewebe, welches sich aus in Kollagen Typ-II und Glykosaminoglykanen eingebetteten Chondrozyten zusammensetzt (Drury & Mooney, 2003; Tan et al., 2009). Natürliche Trägermaterialien sind biologisch abbaubar und gelten daher als besonders wichtige und attraktive Biomaterialien für das Tissue Engineering (Peppas et al., 2006). Sie bieten durch ihre optimale Porengröße eine ideale Mikroumgebung für die Aussaat und Einkapselung von Zellen. Dadurch können diese mit dem Trägermaterial interagieren und somit über das therapeutische Ergebnis entscheiden (Gugatschka et al., 2013). Vertreter der natürlichen Polymere sind u. a. Agarose, Alginat, Chitosan, Kollagen, Fibrin, Gelatine und Hyaluronsäure (Drury & Mooney, 2003), wobei im folgendem Abschnitt nur auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Trägermaterialien näher eingegangen wird.

Kollagen ist in der Herstellung von Knorpelersatzgewebe mittels Tissue Engineering eines der am meisten verwendeten natürlichen polymeren Trägermaterialien, da es Hauptbestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix ist (Hunziker, 2002; Yates et al., 2005). Es erfüllt die Anforderung der Biokompatibilität am besten und bietet den Zellen sehr gute Bindungsmöglichkeiten (Lee & Mooney, 2001). Seine beschränkten mechanischen Eigenschaften können durch physikalische und chemische Behandlungen sowie durch Mischung mit anderen Polymeren verbessert werden (Park et al., 2002; Raghunath et al., 2007). Kollagen wird daher als eines der Standard-Trägermaterialien für das Tissue Engineering betrachtet (Zheng et al., 2009). Hyaluronsäure ist ein nicht-sulfatiertes Glykosaminoglykan und ein weiterer natürlicher Bestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix, welcher zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Morphogenese, Entzündung und Wundheilung beeinflusst (Chen & Abatangelo, 1999; Raghunath et al., 2007). Da dieses Trägermaterial ähnlich wie Kollagen eine hohe Biokompatibilität, Abbaubarkeit und gute Zell-Bindungsmöglichkeiten aufweist, wird es ebenfalls häufig für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe verwendet (Gao et al., 2001; Solchaga et al., 2005). Um seine positiven Eigenschaften zu verstärken, kann dieses ähnlich wie Kollagen zusätzlich chemisch behandelt werden (Brun et al., 1999; Chung & Burdick, 2008; Levett et al.,

2014). Fibrin ist auch ein mögliches Trägermaterial, welches neben seiner Hauptanwendung als Kleber in der Chirurgie auch für das Tissue Engineering verwendet wird (Dragoo et al., 2003; Westreich et al., 2004; Froelich et al., 2010, 2012). Es besteht aus einer kovalenten Quervernetzung zwischen Fibrinogen und Thrombin, den sogenannten Fibrin-clots (Hubbell, 2003), welche eine dichte (Even-Ram, 2009) und stabile (Ryan et al., 1999) Matrix bilden. Es weist ähnlich wie Kollagen eine sehr hohe Biokompatibilität, gute Zell-Bindungsmöglichkeiten und eine begrenzte mechanische Festigkeit auf. Zusätzlich zeigen Fibrinkonstrukte jedoch die Eigenschaft zu schrumpfen. Diese mangelnde Formstabilität ist für eine passgenaue und langfristige Defektdeckung nachteilhaft (Raghunath et al., 2007). Des Weiteren wird Fibrin auch schnell degradiert (Lee et al., 2005; Eyrich et al., 2007a; Li et al., 2009). Agarose ist ein natürliches biokompatibles und zugleich schwer degradierbares Polysaccharid, welches aus asiatischen Meeralgen gewonnen wird. Dieses eignet sich hervorragend zur Herstellung von Hydrogelen und zur Einkapselung von Zellen (Dillon et al., 1998; Lake et al., 2011), bietet den Zellen jedoch schlechte Bindungs- und Wanderungsmöglichkeiten (Raghunath et al., 2007). Die Festigkeit und mechanische Stabilität von Agarosegelen kann durch die anfängliche Agarosekonzentration einfach reguliert werden. Agarosegele wurden ebenfalls bereits für das Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe eingesetzt (Mauck et al., 2000; Shelton et al., 2003; Kelly et al., 2004).

1.3 Zellmarkierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln

Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles, VSOP) sind Eisenoxidteilchen mit Durchmessern zwischen 1 nm und 100 nm. Sie bestehen typischerweise aus Magnetit (Fe_3O_4) oder Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) und können zusätzlich mit einer organischen Hülle wie z. B. aus polymerem Dextran oder monomerem Citrat beschichtet sein. Diese Beschichtungen dienen zur elektrostatischen Stabilisierung der Partikel in wässriger Lösung und verhindern deren Aggregation (Gupta & Gupta, 2005; Laurent et al., 2008). Citrat bietet außerdem den Vorteil, dass es eine endogene und degradierbare Substanz ist und somit optimale Toleranzbedingungen für beschichtete Partikel gewährleistet (Taupitz et al., 2000). Des Weiteren sind VSOP in der Lage mit einem Magnetfeld in Wechselwirkung zu treten. So werden die Partikel beim Anlegen eines Magnetfelds bis zu ihrer Sättigung magnetisiert. Nach Abklingen des Magnetfelds weisen diese dank ihrer superparamagnetischen Eigenschaft keine Restmagnetisierung mehr auf (Wahajuddin & Arora, 2012). Diese Eigenschaft ist größenabhängig und tritt verstärkt bei Durchmessern unter 20 nm auf. Dadurch ist die Reaktion kleinerer Partikel auf ein angelegtes Magnetfeld stärker und schneller (Dave & Gao, 2009).

Eisenoxidnanopartikel werden unter anderem durch endozytotische Mechanismen wie Phagozytose, Pinozytose und unspezifische oder rezeptorbedingte Endozytose in die Zelle aufgenommen (Mahmoudi et al., 2009b; Sohaebuddin et al., 2010; Wu et al., 2010). Die Aufnahme der Partikel kann zusätzlich durch Transfektions-Reagenzien wie z. B. Protamin, Sulfat, Polylysin, kationische Liposomen und Dendrimere, welche auch bei der Komplexbildung Anwendung finden, gefördert werden (Walczak et al., 2005; Berger et al., 2006; Corot et al., 2006; Suzuki et al., 2007). Aufgenommene Partikel können dann für längere Zeiträume in den Endosomen sich langsam teilender Zellen verbleiben oder in die extrazelluläre Umgebung sich schnell teilender Zellen zurück gelangen (Arbab et al., 2004). Ebenso wird vermutet, dass positiv geladene Nanopartikel durch nukleare Porenproteine bis in den Zellkern gelangen (Hong et al., 2011a). Partikel-Eigenschaften wie eine größere Oberfläche sowie eine erhöhte Diffusionsneigung durch Membranen und Gewebearrieren können dabei potentiell Zytotoxizität induzieren. Letztere Eigenschaft hängt mit einer geringen Partikelgröße zusammen. Die zytotoxische Wirkung der Partikel manifestiert sich durch Funktionsbeeinträchtigungen wichtiger Zellkomponenten wie Mitochondrien, Zellkern und DNA (Brunner et al., 2006). Ebenso wurden signifikant toxische Wirkungen wie Entzündung, Apoptose, gestörte Mitochondrienfunktion, eine Membran-Durchlässigkeit für Lactat-Dehydrogenase, Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Stroh et al., 2004), Mikrokerne und Chromosomenkondensationen nach der Exposition von Zellen mit VSOP beobachtet (Jeng & Swanson, 2006). Für eine effiziente Anwendung von VSOP ist es jedoch von hoher Relevanz, dass diese biokompatibel sind und die Biologie und Physiologie der Zellen nicht beeinflussen.

Die Vielzahl der bis heute entwickelten magnetischen Nanopartikel weisen unterschiedliche Größen und Arten der Beschichtungsmaterialien auf. Die Verfeinerung von Synthese und der Beschichtung dieser Partikel führte in den letzten Jahren zu einer Fülle biologischer Anwendungen. Hierzu zählen unter anderem Blut-Pooling (Wagner et al., 2002), Gewebe- und Zell-spezifische Kontrastmittel für die Magnetresonanz-Bildgebung (Hinds et al., 2003; Stroh et al., 2004, 2005), Zellverfolgung und biomolekulare Detektion (Thorek et al., 2006; Focke et al., 2008; Heymer et al., 2008). Ebenso gehören die magnetische Zellseparation (Safarik & Safarikova, 2004; Gao, 2005), gezielte Wirkstoffabgabe (Alexiou et al., 2006; Kohler et al., 2006) und die Induktion von lokaler Hyperthermie (Jordan et al., 2001; Wust et al., 2006) zu weiteren Anwendungsgebieten von Eisenoxid-Nanopartikeln. Intensiv verwendet wurden VSOP vor allem als Zellmarker und Kontrastmittel, da diese die Nachverfolgung markierter Zellen mit nicht-invasiven Nachweisverfahren wie z. B. der Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglichen.

1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Verbesserung derzeitiger Behandlungsstrategien von Stimmlippenlähmungen und Substanzdefekten des Kehlkopfes leisten. Hierfür wird zunächst die chondrogene Differenzierung von Fettgewebstammzellen in Hydrogelkombinationen aus natürlichen Trägermaterialien *in vitro* untersucht. Dies geschieht unter der Verwendung unterschiedlicher chondrogener Wachstumsfaktorkombinationen. Durch die Implantation der Zell-Hydrogelkonstrukte in künstlich generierte Knorpeldefekte *in vitro* und *in vivo* wird dann im nächsten Schritt die klinische Anwendbarkeit bezüglich Integration und Defektdeckung beurteilt. Des Weiteren wird die Anwendung von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln als Zellmarker und Kontrastmittel bezüglich deren Einfluss auf die Biologie und Physiologie der Zellen sowie der Nachweisbarkeit markierter Zellen mittels MRT untersucht.

Dabei wird folgenden Fragen nachgegangen:

- Zeigen die hier verwendeten Fettgewebstammzellen in Anlehnung an die Mindestkriterien für Stammzellen die für Stammzellen typischen Eigenschaften?
- Welche Hydrogelkombinationen bieten bei der Generierung von Knorpelersatzgewebe für die Laryngologie die meisten Vorteile?
- Wie wirken sich unterschiedliche Hydrogelkombinationen und die Verwendung von Wachstumsfaktorkombinationen auf die chondrogene Differenzierung von Fettgewebstammzellen aus?
- Wie verhalten sich vordifferenzierte Konstrukte aus Fettgewebstammzellen und Hydrogelkombinationen nach der Implantation in Knorpeldefekten des *in vitro*- bzw. des *in vivo*-Modells?
- Führt die Markierung von Fettgewebstammzellen mit unterschiedlichen VSOP-Konzentrationen zu einer Beeinträchtigung von Differenzierung, Proliferation, Vitalität und genomischer Stabilität der Zellen?
- Eignen sich VSOP als Zellmarker zum Nachweis und zur Verfolgung markierter Fettgewebstammzellen mittels MRT in der Laryngologie?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Isolierung, Expansion und Phänotypisierung von Fettgewebstammzellen

2.1.1 Spender und Spendertiere

Zur Gewinnung von Fettgewebstammzellen (ASC) für alle zellbasierten Versuche dieser Arbeit wurden humanes und Kaninchen-Fettgewebe ausgewählt. Für die Isolierung von humanen ASC wurden Liposuktionsmaterial und Fettschürzen verwendet, die vom Universitätsklinikum Würzburg, Klinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie (Direktor: Prof. Dr. R. Meffert), zur Verfügung gestellt wurden (Ethikantrag Nr. 72/06 sowie schriftliche Einwilligung der Patienten nach Aufklärung über das Versuchsvorhaben durch einen approbierten Arzt). Alter und Geschlecht der Spender sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Patientenalter und -geschlecht

Spender Nr.	Geschlecht	Alter in Jahren
1	W	23
2	W	25
3	W	32
4	M	40
5	W	41
6	W	44
7	M	47
8	W	54
9	W	55
10	M	60
11	W	61
12	W	63
13	W	73

Für die Isolierung von Kaninchen-Fettgewebstammzellen wurde Nackenfettgewebe entnommen (Tierversuchsvorhaben Nr. 67/09). Bei den Spendertieren handelte es sich um 14 weibliche Kaninchen (Weiße Neuseeländer, *Oryctolagus cuniculus*, Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA, USA) mit einem Gewicht von 3 bis 4 kg (Tiere Nr. 3, 4, 5, 6, 12, 26, 37, 39, 44, 47, 2016, 4047, 5018, 5084).

2.1.2 Isolierung, Expansion und Kryokonservierung

Die hier verwendete Methode zur Isolierung von Fettgewebstammzellen basiert auf dem Prinzip von Rodbell (1964). Diese wurde in Anlehnung an die Beschreibungen von Zuk et al. (2001) und Zhu et al. (2013), in leicht modifizierter Weise durchgeführt und wird in folgendem Abschnitt kurz erläutert.

2.1.2.1 Humane Fettgewebstammzellen

Liposuktionsmaterial wurde in sterile Glasflaschen (Schott AG, Mainz, D) gegeben, während Fettgewebe aus Fettschürzen mit sterilen Scheren und Skalpellen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) für den Gewebeverdau zuvor zerkleinert werden musste. Das blutige Fettgewebe wurde zweimal mit sterilem Zellwaschpuffer gewaschen und anschließend die Flüssigkeit (siehe Abbildung 1 A) mit einer Pasteurpipette (Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D) und einer Vakuumpumpe (Two Stage Edward's, GEC Electronics, Newcastle, UK) abgesaugt. Der Zellwaschpuffer bestand aus 1 x phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Roche Diagnostics, Mannheim, D) plus 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen-Strep, Biochrom AG, Berlin, D). Um das Gewebe zu verdauen, wurde im nächsten Schritt in jede Flasche das 0,3-fache des Fettvolumens an einer Zellwaschpuffer-Enzym-Mischlösung gegeben. Diese beinhaltete 10 mg Kollagenase P (Roche Diagnostics) je 100 ml Fettgewebe und wurde vor der Zugabe steril filtriert (0,45 µm Sterilfilter, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D). Die Flaschen wurden dann mit Deckeln und Parafilm® (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA) verschlossen und das Fettgewebe-Enzym-Gemisch in einem Schüttelinkubator (TH 25, Edmund Bühler, Tübingen, D) bei 37° C mit 100 rpm für 3 h verdaut (siehe Abbildung 1 B).

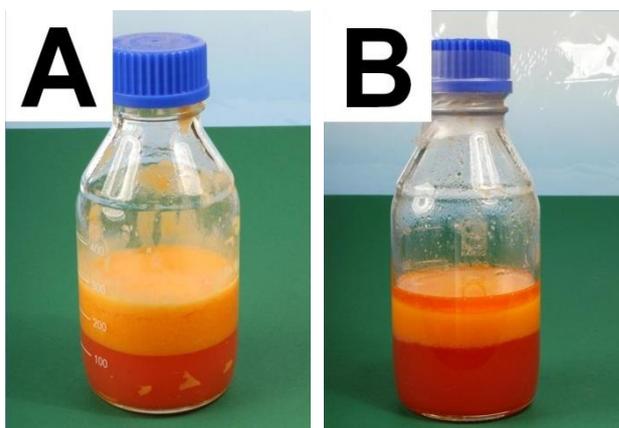


Abbildung 1:

Humanes Fettgewebe zur Isolierung von Fettgewebstammzellen. A: Fettgewebe mit oberer Fett- und unterer Blutphase vor dem Kollagenaseverdau. B: Fettgewebe nach 3-stündigem Kollagenaseverdau. Die obere und mittlere Schicht besteht aus reifen Fettzellen bzw. Fett/Stroma, während sich unten die Blutphase befindet (Quelle: PD Dr. med. Katrin Frölich, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen, Universitätsklinikum Würzburg).

Nach dem Verdau wurde das Gemisch auf 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) verteilt und mit 1300 rpm für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, D). Von den drei resultierenden Phasen Zellpellet, Blutphase und Fettphase wurden jeweils die Blut- und Fettphase abgekippt. Die

verbliebenen Pellets wurden in jeweils 5 ml sterilem Erythrozyten-Lysepuffer (pH 8) resuspendiert. Dieser setzte sich aus 4,1 g Ammoniumchlorid (Merck KGaA, Darmstadt, D) plus 0,5 g Kaliumhydrogencarbonat (Merck KGaA) plus 0,2 mM Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) gelöst in 500 ml destilliertem Wasser zusammen. Bis zu 4 solcher Ansätze des gleichen Spenders wurden vereinigt und für 10 min bei 37° C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze erneut mit 1300 rpm für 10 min zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Die Zellpellets wurden dann durch Resuspendieren in je 10 ml Zellwaschpuffer gewaschen, mit 1300 rpm für 10 min zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Nun wurden die Zellpellets in 10 ml Expansionsmedium resuspendiert, welches aus 1 x Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) plus 10% fötalem Kälberserum (BSF, Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, D) plus 1% Pen-Strep bestand. Um Bindegewebsreste zu entfernen, wurde diese Zellsuspension anschließend auf 100 µm Zellsiebe (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) gegeben. Entsprechend der vorherigen Pelletgröße wurde die filtrierte Zellsuspension auf 75 cm² (mittlere) oder 175 cm² (große) Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) verteilt, mit Expansionsmedium auf 12 ml bzw. 25 ml aufgefüllt und bei 37° C und 5% CO₂ in einem Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, D) expandiert.

Am Tag nach der Isolierung wurden die Zellkulturflaschen mit 5 bis 10 ml Zellwaschpuffer gewaschen und im Anschluss mit frischem Expansionsmedium versehen. Der Mediumwechsel erfolgte dann jeweils montags, mittwochs und freitags. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen dann im Verhältnis 1:2 oder 1:3 gesplittet. Hierfür wurde zunächst das Medium aus den Flaschen abgesaugt, diese mit 10 ml Zellwaschpuffer gewaschen, und je Flaschengröße 3 bis 5 ml 1 x 0,25% Trypsin-EDTA (Life Technologies Corporation) zugegeben. Nach 4 min wurden die Zellen erst durch Klopfen auf den Flaschenboden und dann mit Hilfe einer Pipette vom Flaschenboden abgespült. Die Trypsinisierung wurde anschließend durch Zugabe von 5 ml Expansionsmedium je Flasche gestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf neue Zellkulturflaschen zur weiteren Expansion der Zellen bis maximal zur Passage 2 verteilt. Nachfolgend wurden diese expandierten Zellen bis zur Versuchsdurchführung kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen in Einfriermedium bestehend aus BSF plus 10% Pen/Strep plus 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Corporation) resuspendiert. Die Zelldichte betrug 1 Mio Zellen pro ml Einfriermedium. Je 1 Mio Zellen wurden in ein Kryokonservierungsröhrchen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gegeben und für 2 Tage in einem mit reinem Isopropanol (Sigma-Aldrich Corporation) gefüllten Gefrierbehälter (Mr Frosty, Thermo Fisher Scientific Inc.) bei -80° C

langsam eingefroren. Anschließend wurden die Röhrrchen in einen Stickstofftank (Cryopal Air Liquide, Marne la Vallee, F) zur Kryokonservierung bei -170°C überführt. Um die kryokonservierten Zellen wieder zu verwenden, wurden die benötigten Röhrrchen in einem Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co., Burgwedel, D) bei 37°C aufgetaut und je 1 Mio Zellen in eine mit Expansionsmedium gefüllte Zellkulturflasche gegeben und bis maximal zur Passage 4 expandiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einem automatisierten Zellzählgerät (CASY®, Innovatis AG, Reutlingen, D). Je Probe wurden 100 μl Zellsuspension mit 10 ml Casy-Ton-Lösung (Innovatis AG) in einem Casy-Cup-Behälter (Innovatis AG) vermischt und anschließend am Zellzählgerät gezählt. Am Gerät erfolgte die Ausgabe in Zellen pro ml Suspension.

2.1.2.2 Kaninchen- Fettgewebstammzellen

Um in Kaninchen körpereigene Zellen implantieren bzw. injizieren zu können, wurden für die zellbasierten *in vivo*-Versuche dieser Arbeit Fettgewebstammzellen aus Kaninchen-Fettgewebe isoliert. Hierfür waren chirurgische Eingriffe an den Spendertieren notwendig, welche von Frau PD Dr. med. Katrin Frölich und Frau Dr. rer. nat. Antje Technau mit Assistenz von Frau Petra Joa durchgeführt wurden. Hierzu wurde durch die intramuskuläre Injektion einer Mischung aus 5 mg Xylazin/kg (CP-Pharma GmbH, Burgdorf, D) und 35 mg Ketamin/kg (Ketanest S, 25 mg Esketaminhydrochlorid/ml, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, D) bei den Spendertieren die Anästhesie eingeleitet. Alle operativen Eingriffe wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In Narkose wurden die Kaninchen am Nacken rasiert und die Haut mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Das Fettgewebe wurde entnommen (siehe Abbildung 2) und in ein Falcon-Röhrrchen mit Zellwaschpuffer überführt. Im Anschluss wurde die Wunde mit resorbierbaren Nähten verschlossen.



Abbildung 2:

Entnahme von Kaninchenhalsfett unter sterilen Bedingungen für die Isolierung von Fettgewebstammzellen (Quelle: PD Dr. med. Katrin Frölich, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen, Universitätsklinikum Würzburg).

Die Isolierung, Expansion und Kryokonservierung von Kaninchen-ASC erfolgte analog zum Vorgehen bei humanem Fettgewebe. Für die Expansion und Kryokonservierung von Kaninchen-ASC wurde Kaninchenserum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, A) anstatt BSF verwendet.

2.1.3 Phänotypisierung

2.1.3.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine laserbasierte, biophysikalische Technologie, die bei der Zellzählung, Zellsortierung sowie bei der Detektion von zellulären Biomarkern und Proteinen Einsatz findet. Hierfür wird eine Zellsuspension in Form eines dünnen Flüssigkeitsstrahls durch einen elektronischen Detektionsapparat geleitet. In diesem sind Detektoren genau auf den Punkt gerichtet, an dem der Strom den Lichtstrahl passiert. Einer dieser Detektoren (Forward Scatter oder FSC) liegt in Richtung des ursprünglichen Strahls, während sich auf horizontaler Ebene rechtwinklig zum ursprünglichen Strahl ein weiterer Detektor (Side Scatter oder SSC) befindet. Auch ein oder mehrere Fluoreszenzdetektoren gehören zu diesen Detektoren. Jedes passierende Teilchen von 0,2 bis 150 µm Durchmesser streut dabei den Lichtstrahl. Fluoreszierende Chemikalien dieser Teilchen werden dadurch zur Emission von Licht angeregt, welches von den Detektoren aufgenommen und analysiert wird. Dadurch können verschiedene Informationen über physikalische und chemische Strukturen von jedem Teilchen abgeleitet werden (siehe Abbildung 3). Dies ist mit einer Geschwindigkeit von bis zu Tausenden von Partikeln pro Sekunde möglich.

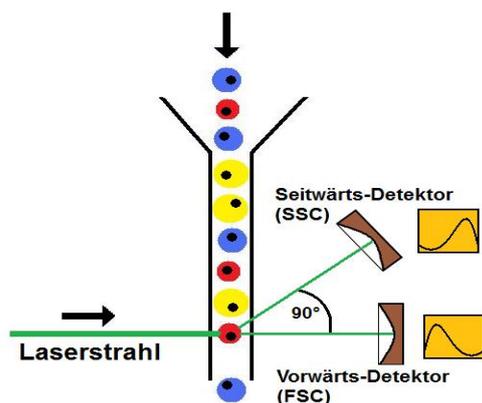


Abbildung 3:

Grundprinzip der Durchflusszytometrie: Zellsuspension als Flüssigkeitsstrahl beim Passieren des Laserstrahls. Es kommt zur Streuung des Lichtstrahls, die von den Detektoren gemessen wird. Dies gibt Auskunft über physikalische und chemische Strukturen sowie über die Größe der Zellen. Die Farben Gelb, Rot und Blau stellen unterschiedliche Zelltypen dar.

Ein Durchflusszytometer ist ein leistungsstarkes Instrument, da es eine schnelle, objektive und quantitative Erfassung der Fluoreszenz-Signale von einzelnen Zellen ermöglicht. Wichtig hierfür sind Fluorochrome, die als spezifische Oberflächenmarkerproteine in der Durchflusszytometrie verwendet werden. Diese sind entweder an Antikörper gekoppelt, um Zielstrukturen auf oder in der Zelle zu erkennen, oder an eine chemische Einheit

gebunden, die eine Affinität zur Zellmembran oder anderen zellulären Strukturen besitzt. Jedes Fluorochrom hat charakteristische Wellenlängen für die Anregung und Emission, welche sich häufig überlappen. Dadurch ist die Verwendung von Oberflächenmarkerprotein-Kombinationen von der Wellenlänge der vorhandenen Lampe(n) oder Laser als auch von den zu Verfügung stehenden Detektoren abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren angewendet, um die hier verwendeten humanen Fettgewebstammzellen von 8 Spendern auf spezifische Oberflächenmarkerproteine zu untersuchen, die diese als mesenchymale Stammzellen charakterisieren.

2.1.3.2 Versuchsdurchführung

Hierfür wurden Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) bis zur Passage 2 expandiert, abgelöst, gezählt, zentrifugiert und in Expansionsmedium resuspendiert. Je Spender wurden dann 120.000 Zellen in FACS-Röhrchen (Sarstedt AG & Co) gegeben, bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Zellpellets wurden dann in 1 ml 1 x PBS plus 10% BSF resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte dann ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 5 min und Verwerfen der Überstände. Die Zellpellets wurden dann in einer Mischlösung aus 1 x PBS plus 0,05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporation) plus Antikörper (Becton Dickinson and Company) resuspendiert und erneut für 1 h auf Eis inkubiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Beschreibung	Klon	Isotyp	Fluorochrom
CD34	Hematopoietic stem cell marker (Best.-Nr. 550761)	RAM 34	Rat IgG2a	PE
CD44	Phagocytic glycoprotein-1 (Best.-Nr. 555478)	G44-26	Mouse IgG2b	FITC
CD45	Leukocyte common antigen (Best.-Nr. 555482)	30-F11	Rat IgG2b	FITC
CD73	Ecto-5'-nucleotidase (Best.-Nr. 550257)	AD2	Mouse IgG1	PE
CD90	Thymocyte-1 membrane glycoprotein (Best.-Nr. 559869)	5E10	Mouse IgG1	APC
CD105	TGF- β 1 receptor complex, Endoglin (Best.-Nr. 555690)	MJ7/18	Rat IgG2a	FITC

CD (cluster definiert), PE (Phycoerythrin), FITC (Fluorescein Isothiocyanat), APC (Allophycocyanin)

Die Antikörper-Mischlösungen ergaben sich aus 500 μ l 1 x PBS plus 0,05% Triton X-100 plus Antikörper (1 μ l für Anti-CD90 und Anti-CD105; 20 μ l für Anti-CD34, Anti-CD44, Anti-

CD45 und Anti-CD73). Da der Antikörper Anti-CD105 ursprünglich nicht konjugiert war, musste dieser in einem weiteren Schritt mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper (FITC, Alexa Fluor® 488 Anti-Mouse, 1:1000, Life Technologies Corporation) konjugiert werden. Hierfür wurden die Proben bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und für 30 min auf Eis mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nachfolgend wurden alle Proben 2 x mit 1 x PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min, Verwerfen der Überstände und Resuspendieren in 1 x PBS) und zu jeder Probe 500 µl Zellwaschlösung (Becton Dickinson and Company) hinzugegeben. Am Durchflusszytometer (BD FACSCanto, Becton Dickinson and Company) wurden über eine spezielle Software (BD FACSDiva Software, Version 5.0.3, Becton Dickinson and Company) FSC (250 V), SSC (400 V), PE (307 V), APC (500 V) und FITC (291 V) eingestellt. Je Probe wurden 10.000 Zellen gezählt. Die Durchflusszytometrie wurde mit und ohne Antikörper-markierten ASC durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die oben genannte Software.

2.2 Multidifferenzierungspotential von Fettgewebstammzellen zu phänotypähnlichen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen

Eine typische Eigenschaft von Stammzellen ist es, dass sie zu unterschiedlichen Zelltypen differenziert werden können. Um zu untersuchen, ob diese Eigenschaft auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Fettgewebstammzellen vorlag, wurde deren Differenzierungspotential zu phänotypähnlichen Fett- und Knochenzellen nach Pittenger et al. (1999) sowie zu phänotypähnlichen Knorpelzellen nach Johnstone et al. (1998) mit modifizierten Protokollen untersucht (siehe Abbildung 4).

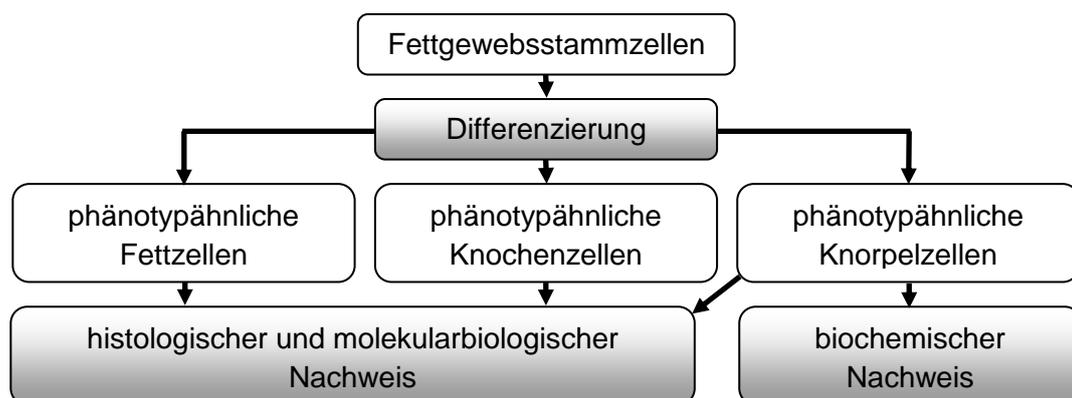


Abbildung 4: Schematische Darstellung zur Untersuchung des Multidifferenzierungspotentials von Fettgewebstammzellen. ASC wurden zu phänotypähnlichen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen differenziert. Der Nachweis der Differenzierung erfolgte histologisch, molekularbiologisch und biochemisch.

Als Negativkontrollen dienten undifferenzierte ASC. Die entsprechenden Nachweise der Differenzierung erfolgten mittels histologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden.

2.2.1 Induktion der Differenzierung

Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) wurden in großen Zellkulturflaschen bis zur Passage 4 expandiert, aus den Flaschen abgelöst, die Zellen gezählt und in Expansionsmedium resuspendiert.

Für die histologische Untersuchung der adipogenen und osteogenen Differenzierung sowie der undifferenzierten ASC wurden die Zellen in viergeteilten Gewebekulturschalen (35 x 10 mm, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Von jedem Spender wurden 4 Schalen pro Differenzierung (adipogen, osteogen und undifferenziert) angesetzt und je Schale 4 x 15.000 Zellen ausgesät. Diese wurden anschließend mit je 100 µl Expansionsmedium versehen und über Nacht im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Für die molekularbiologische Untersuchung der adipogenen und osteogenen Differenzierung sowie der undifferenzierten ASC wurden die Zellen in 6-Lochplatten (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Von jedem Spender wurden 3 Wells pro Differenzierung (adipogen, osteogen und undifferenziert) angesetzt und je Well 150.000 Zellen ausgesät. Diese wurden anschließend mit je 2 ml Expansionsmedium versehen und ebenfalls über Nacht im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

Die histologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchung der chondrogenen Differenzierung erfolgte mit hochdichten Zellkugeln. Hierfür wurden je Spender 4 x 300.000 ASC in 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH) gegeben und mit Expansionsmedium auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt. Die Röhrchen mit den Zellsuspensionen wurden dann für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, in den Brutschrank gestellt und über Nacht bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurde bei sämtlichen Ansätzen das Expansionsmedium abgesaugt und durch das entsprechende adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierungsmedium (siehe Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5) ersetzt.

Tabelle 3: Adipogenes Differenzierungsmedium

Komponente	Stockkonzentration	Menge	Endkonzentration
Expansionsmedium		50 ml	
Insulin*	1 mg/ml	50 µl	1 µg/ml
Dexamethason**	1 mM	50 µl	1 µM
3-Isobutyl-1-methylxanthin**	500 mM	50 µl	500 µM
Indomethacin**	100 mM	50 µl	100 µM

* PAA Laboratories GmbH; ** Sigma-Aldrich Corporation

Tabelle 4: Osteogenes Differenzierungsmedium

Komponente	Stockkonzentration	Menge	Endkonzentration
Expansionsmedium		50 ml	
L-Ascorbinsäure-2-phosphat*	50 mg/ml	50 µl	50 µg/ml
Dexamethason	1 mM	50 µl	100 nM
β-Glycerolphosphat*	1 M	50 µl	10 mM

* Sigma-Aldrich Corporation

Tabelle 5: Chondrogenes Differenzierungsmedium

Komponente	Stockkonzentration	Menge	Endkonzentration
DMEM plus 1% Pen/Strep		50 ml	
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	50 mg/ml	50 µl	50 µg/ml
Dexamethason	1 mM	5 µl	0,1 µM
Pyruvat*	100 mg/ml	50 µl	100 µg/ml
L-Prolin*	40 mg/ml	50 µl	40 µg/ml
Insulin-Transferrin-Selen (ITS+1) Mediumzusatz*	100 x	500 µl	1 x
transformierender Wachstumsfaktor-TGF-β3**	10 ng/µl	50 µl	10 ng/ml

* Sigma-Aldrich Corporation; ** Promocell GmbH, Heidelberg, D

Bei den Ansätzen, die nicht differenziert werden sollten, wurde dieser Schritt nicht durchgeführt, da deren Kultivierung nur mit Expansionsmedium erfolgte. Ansätze in viergeteilten Gewebekulturschalen wurden mit je 4 x 100 µl Differenzierungsmedium, in 6-Lochplatten mit je 2 ml Differenzierungsmedium pro Well und hochdichte Zellkugeln mit je 1 ml Differenzierungsmedium versehen. Die Kultivierung der Ansätze erfolgte bei 37° C und 5% CO₂ und das Medium wurde jeweils montags, mittwochs und freitags gewechselt. Die Ansätze der adipogenen Differenzierung und die der undifferenzierten Negativkontrolle wurden über 14 Tage, die der osteogenen und chondrogenen Differenzierung wurden über 21 Tage bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.2 Histologischer Nachweis der Differenzierung

2.2.2.1 Aufbereitung der Ansätze

Die verschiedenen Differenzierungen wurden mit histologischen Färbungen qualitativ nachgewiesen. Hierfür mussten die Zellen der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungsansätze sowie die der undifferenzierten Ansätze am Ende der Kultivierung zunächst fixiert werden. Von den Ansätzen in viergeteilten Gewebekulturschalen und in 6-Lochplatten sowie von den hochdichten Zellkugeln, die für die Histologie vorgesehen waren, wurde hierfür das Medium abgesaugt und zur Fixierung für 10 min durch dasselbe Volumen an 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (Serva Electrophoresis GmbH & Co. KG, Heidelberg, D) ersetzt. Nach Absaugen der Fixierlösung

wurde destilliertes Wasser auf die fixierten Zellen gegeben und die Ansätze bei 4° C bis zur histologischen Untersuchung im Kühlschrank aufbewahrt. Die hochdichten Zellkugeln wurden zur Stabilisierung des Gewebes über Nacht bei 4° C in 30%iger Glukose-Lösung (Merck KGaA) inkubiert und am nächsten Tag in Tissue Tek® Cryomold® Einbettenschälchen (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL) gegeben, in Tissue Tek® OCT Compound Fixiergel (Sakura Finetek Europe B.V.) eingebettet und bei -20° C für mindestens 24 h eingefroren. Die eingebetteten Zellkugeln wurden dann an einem Kryostaten (Leica CM 1510S, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D) bei -24° C geschnitten. Die Schnittdicke betrug 10 µm und jeder Objektträger (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, D) wurde mit 4 Schnitten versehen. Die Objektträger wurden danach in Objektträgerkästen (A. Hartenstein, Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik GmbH, Würzburg, D) für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

Vor den entsprechenden Färbungen wurden die Objektträger 3 x für 5 min mit 1 x PBS rehydriert und dann in einer Mischung aus Aceton und Methanol (beide: Sigma-Aldrich Corporation) im Volumenverhältnis 1:1 für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach darauffolgender 30-minütiger Trocknung unter dem unsterilen Abzug (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, D) wurden die Schnitte erneut für 5 min mit 1 x PBS rehydriert und konnten anschließend gefärbt werden. Die Färbung der Objektträger erfolgte in Glasküvetten. Ansätze in 6-Lochplatten und viergeteilten Gewebekulturschalen wurden direkt in diesen gefärbt. Nach den Färbungen wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und für 10 min unter dem unsterilen Abzug getrocknet. Objektträger wurden dann noch mit Entellan® (Merck KGaA) eingedeckt. Die Auswertung und Fotodokumentation der histologischen Untersuchung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 4000B + Leica CTR 4000, Leica Microsystems GmbH) mit Durchlicht.

2.2.2.2 Ölrot O-Färbung zum Nachweis von Lipiden

Ölrot O ist ein Farbstoff der für die Färbung von neutralen Triglyceriden, Lipiden und Lipoproteinen verwendet wird. Intrazelluläre Lipidvakuolen werden rot und Zellkerne, durch Gegenfärbung mit einer wässrigen Hämatoxylin-Lösung, violett gefärbt.

Hierfür wurde auf die Ansätze der adipogenen Differenzierung in viergeteilten Gewebekulturschalen 100%iges Propylenglykol für 5 min (Sigma-Aldrich Corporation) gegeben. Dieses wurde dann abgesaugt und anschließend die Ansätze für 10 min mit auf 60° C erwärmter Ölrot O-Lösung überschichtet. Letztere Lösung setzte sich aus 0,5 g Ölrot O (Sigma-Aldrich Corporation) gelöst in 100 ml Propylenglykol zusammen. Nach Absaugen der Färbelösung wurde auf die Ansätze kurz 85%ige, wässrige Propylenglykol-

Lösung gegeben, 3 x mit destilliertem Wasser gewaschen und dann für 30 sec in Mayers Hämatoxylin-Lösung (Merck KGaA) gegeben. Erneut wurden die Ansätze dann 3 x mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zur Auswertung und Dokumentation am Mikroskop mit destilliertem Wasser feucht gehalten.

2.2.2.3 Von Kossa-Färbung zum Nachweis von Calcium-Ablagerungen

Die von Kossa-Färbung wird zum Nachweis von Calcium- oder Calciumsalz-Ablagerungen verwendet. Werden calciumhaltige Gewebeproben in eine Silbernitrat-Lösung gegeben, so setzt sich das Silber ab und ersetzt das Calcium, das zuvor durch eine starke Lichteinwirkung reduziert wurde. Metallisches Silber wird somit als Graufärbung sichtbar. Zellkerne sind durch eine Kerngegenfärbung mit Kernechtrot rot gefärbt.

Die Ansätze der osteogenen Differenzierung in viergeteilten Gewebekulturschalen wurden mit einer wässrigen, 1%igen Silbernitrat-Lösung (Merck KGaA) bedeckt und für 20 min unter eine UV-Lampe (Desaga Uvis, C. Desaga, Heidelberg, D) gestellt. Nach Absaugen der Lösung wurden diese dann 3 x mit destilliertem Wasser gewaschen, für 5 min mit 5%iger, wässriger Natriumthiosulfat-Lösung (Merck KGaA) überschichtet und danach erneut mit destilliertem Wasser gewaschen. Nachfolgend wurde für 5 min eine Kernechtrot-Lösung auf die Ansätze gegeben, gefolgt von einem 1-minütigem Waschschrift mit destilliertem Wasser.

2.2.2.4 Alizarinrot S-Färbung zum Nachweis von Calcium-Ablagerungen

Alizarin ist eine organische Verbindung die im Laufe der Geschichte hauptsächlich als roter Farbstoff zum Färben von Textilien verwendet wurde und zum Nachweis von Calcium dient. Freies und ionisches Calcium bildet Präzipitate mit Alizarin, wodurch calciumhaltiges Gewebe rot gefärbt wird. Reines Calcium und Calcium in Knochen und anderen Geweben können mit diesem Verfahren nachgewiesen werden.

Ansätze der osteogenen Differenzierung in viergeteilten Gewebekulturschalen wurden mit einer 2%igen, wässrigen Alizarinrot S-Lösung (pH 4,1 - 4,3; Sigma-Aldrich Corporation) für 5 min überschichtet. Unmittelbar nach Absaugen der überschüssigen Lösung wurden die Ansätze vor der Bildung von Kristallen am Mikroskop fotografiert.

2.2.2.5 Alcianblau-Färbung zum Nachweis von Knorpelmatrixproteinen

Die Alcianblau-Färbung wird verwendet, um saure Proteoglykane in Knorpel und anderen Strukturen des Körpers sowie einige Arten von Mucopolysacchariden durch eine Blaufärbung nachzuweisen. Die Zellkerne sind durch eine Kerngegenfärbung mit Kernechtrot rot gefärbt.

Hierfür wurden Objektträger mit Gewebeschnitten der hochdichten Zellkugeln für 3 min in 3%iger Eisessig-Lösung (pH 2,5, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL) und dann für 30 bis 60 min in Alcianblau-Lösung gegeben. Diese Färbelösung bestand aus 1 g Alcianblau (Sigma-Aldrich Corporation) gelöst in 100 ml 3%iger Eisessig-Lösung. Danach wurden die Objektträger 3 x mit destilliertem Wasser für je 1 min gewaschen und dann für 5 min in Kernechtrot-Lösung getaucht. Im Anschluss folgte ein 1-minütiger Waschschrift mit destilliertem Wasser.

2.2.2.6 Safranin-O-Färbung zum Nachweis von Knorpelmatrixproteinen

Mit der Safranin-O-Färbung können unter anderem sulfatierte Proteoglykane in Knorpel und anderen Geweben durch eine rote Färbung nachgewiesen werden. Durch eine Kerngegenfärbung mit Weigerts-Eisenhämatoxylin sind die Zellkerne schwarzbraun gefärbt.

Objektträger mit Gewebeschnitten der hochdichten Zellkugeln wurden hierfür für 10 min in Weigerts-Eisenhämatoxylin-Lösung (Merck KGaA) gegeben, dann für 5 min mit destilliertem Wasser und in einem weiteren Schritt für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Objektträger für 10 min in 0,1%ige, wässrige Safranin-O-Lösung (Sigma-Aldrich Corporation) getaucht und zuletzt für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.2.7 Pikrosiriusrot-Färbung zum Nachweis von Kollagen

Sirius-Rot ist ein starker anionischer Farbstoff, welcher Kollagen durch die Reaktion seiner Sulfonsäuregruppen mit basischen Gruppen des Kollagenmoleküls anfärbt. Die verlängerten Farbstoffmoleküle binden so an die Kollagenfasern, dass ihre Längsachsen parallel zueinander sind. Diese parallele Beziehung zwischen Farbstoff und Kollagen führt zu einer verbesserten Doppelbrechung, die als Kollagen-spezifisch angesehen werden kann (Junqueira et al., 1979). Durch die Färbung mit Sirius-Rot wird Kollagen rot und das restliche Gewebe gelb angefärbt.

Gewebeschnitte der hochdichten Zellkugeln auf Objektträgern wurden für 10 min in 1%iger Eisessig-Lösung und dann für 10 min in Weigerts Hämatoxylin-Lösung getaucht. Nach einem kurzen Waschschrift mit destilliertem Wasser wurden die Objektträger für 40 min in Pikrosiriusrot-Lösung gegeben. Diese setzte sich aus 0,5 g Direct Red 80 (Sigma-Aldrich Corporation), gelöst in 500 ml 1,3 %iger Pikrinsäure (Merck KGaA), zusammen. Anschließend wurden die Objektträger erneut mit 1%iger Eisessig-Lösung kurz gewaschen.

2.2.3 Biochemischer Nachweis der Differenzierung

2.2.3.1 Aufbereitung der Ansätze

Die nachfolgend beschriebenen biochemischen Assays ermöglichen einen quantitativen Nachweis der Sekretion von Knorpelmatrixproteinen wie Glykosaminoglykane und Kollagen. Diese Untersuchungen wurden für die hochdichten Zellkugeln nach der chondrogenen Differenzierung durchgeführt. Zunächst wurde von jedem Zellkugeln der DNA-Gehalt bestimmt, welcher als Bezugswert für den Kollagen- und Glykosaminoglykangehalt diente.

Je ein hochdichtes Zellkugeln von jedem Spender wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co) zusammen mit 1 ml Papain-Lösung gegeben und bei 60° C in einem kleinen Schüttelinkubator (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf AG) verdaut. Die Papain-Lösung wurde über eine Papain-Stammlösung aus 25 mg Papain (Sigma-Aldrich Corporation) gelöst in 20 ml L-Cysteinpuffer vorbereitet. Je 500 µl dieser Stammlösung wurden dann zu 4,5 ml L-Cysteinpuffer gegeben. Dieser setzte sich aus 302,5 mg L-Cystein (Sigma-Aldrich Corporation) gelöst in 200 ml 1 x PBS plus 5 ml 0,5 M EDTA (pH 6,0) plus 295 ml destilliertes Wasser zusammen. Am nächsten Tag wurden die Reaktionsgefäße für 10 min mit 12.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf miniSpin Zentrifuge, Eppendorf AG) und von jedem Gefäß 2 x 333 µl des Überstands (1 x für den Kollagengehalt und 1 x für den Glykosaminoglykangehalt) in je ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Die verbleibenden 333 µl der ursprünglichen Lyselösung wurden für die Bestimmung des DNA-Gehalts verwendet.

2.2.3.2 Bestimmung des DNA-Gehalts

Auf jedes Reaktionsgefäß mit den verbliebenen 333 µl Inhalt wurde dasselbe Volumen eines Gemisches aus Phenol (Life Technologies Corporation), Chloroform (Sigma-Aldrich Corporation) und Isoamylalkohol (Sigma-Aldrich Corporation) im Volumenverhältnis 25:24:1 gegeben, durch Verwirbeln (Vortexer, Dragon Laboratory Instruments Limited, Beijing, RC) gemischt und anschließend für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Oberphasen wurden in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße gegeben, mit je 33 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 (Merck KGaA) versehen und durch Invertieren gemischt. Im Anschluss wurden in jedes Reaktionsgefäß 666 µl 100%iger Ethanol reinst (Sigma-Aldrich Corporation) gegeben, durch Invertieren gemischt und die Gefäße über Nacht bei -20° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, die Überstände verworfen und die entstandenen Pellets in 200 µl TEN-Puffer (pH 7,4) resuspendiert. Dieser Puffer wurde aus 100 mM Natriumchlorid (Merck KGaA) plus 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck KGaA) plus 1 mM Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Na₂-EDTA, Sigma-Aldrich Corporation), gelöst in

destilliertem Wasser, hergestellt. In Messküvetten (Eppendorf UVette® 220-1600 nm, Eppendorf AG) wurden je 3 µl von jedem Reaktionsgefäß zusammen mit 147 µl TEN-Puffer gegeben und der DNA-Gehalt an einem Photometer (Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf AG) gemessen. Als Reagenzleerwert dienten 150 µl TEN-Puffer. Die Multiplikation der ausgegebenen Werte mit den ursprünglichen Gesamtvolumina (147 µl x 3) ergab den Gesamt-DNA-Gehalt in µg.

2.2.3.3 Bestimmung des Kollagengehalts

Zur Bestimmung des Kollagengehalts wurden die Reagenzien sowie das Versuchsprotokoll des Sircol® Soluble Collagen Assay Kits (Biocolor Ltd, Carrickfergus, UK) verwendet. Zunächst musste für diesen Assay eine Verdünnungsreihe der Kollagen-Standardlösung nach Tabelle 6 hergestellt werden.

Tabelle 6: Verdünnungsreihe der Kollagen-Standardlösung

Gehalt (µg)	Standard-Lösung (µl)	destilliertes Wasser (µl)
20	40	60
15	30	70
10	20	80
5	10	90
1	2	98
0	0	100

Von den Reaktionsgefäßen mit den 333 µl Lösung aus verdauten Zellkugeln wurden je 100 µl entnommen und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu diesen und zu den Gefäßen der Verdünnungsreihe wurde je 1 ml Sircol®-Färbereagenz gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden dann für 30 min auf einem Schüttler (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) mit rotierenden Bewegungen bei Raumtemperatur inkubiert, für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und die Überstände durch Invertieren verworfen. Jedes Gefäß wurde dann mit 750 µl eiskalter Essigsäure-Waschlösung versehen und erneut für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände durch Invertieren wurden die entstandenen Pellets in 250 µl alkalischer Reagenz durch Verwirbeln resuspendiert. Zum Schluss wurden aus jedem Reaktionsgefäß 2 x 100 µl als Duplikate auf eine 96-Lochplatte (Becton Dickinson and Company) gegeben und die Absorption bei 570 nm am ELISA-Plattenlesegerät (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, Titertek Multiskan® Plus MK II Microplate Reader, Eflab Labsystems Oy, Helsinki, FIN) gemessen. Mit den erhaltenen Absorptionswerten der Standard-Verdünnungsreihe mit bekanntem Kollagengehalt wurde eine Standardkurve erstellt. Mit dieser konnte der Kollagengehalt der Lösungen aus verdauten Zellkugeln bestimmt werden. Eine Multiplikation dieser Werte mit den ursprünglichen

Gesamtvolumina ($\times 10$) ergab die Gesamtkollagengehalte, welche dann auf die entsprechenden Gesamt-DNA-Gehalte bezogen wurden (μg Kollagen/ μg DNA).

2.2.3.4 Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts

Für die Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts wurden die Reagenzien und das Versuchsprotokoll des Blyscan® Sulfated Glycosaminoglycan Assay Kits (Biocolor Ltd) verwendet. Für diesen Assay wurde ebenfalls vor Beginn eine Verdünnungsreihe der Glykosaminoglykan-Standardlösung nach Tabelle 7 hergestellt.

Tabelle 7: Verdünnungsreihe der Glykosaminoglykan-Standardlösung

Gehalt (μg)	Standard-Lösung (μl)	destilliertes Wasser (μl)
5	50	50
4	40	60
3	30	70
2	20	80
1	10	90
0	0	100

Je 100 μl wurden von den Reaktionsgefäßen mit den 333 μl Lösung aus verdauten Zellkugeln entnommen und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu jedem dieser Gefäße und zu denen der Verdünnungsreihe wurden 1 ml Blyscan®-Färbereagenz zugegeben und für 30 min auf dem Schüttler mit rotierenden Bewegungen bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gefäße für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, die Überstände durch Invertieren verworfen, je 500 μl Dissoziations-Reagenz zugegeben und die entstandenen Pellets durch längeres Verwirbeln resuspendiert. Zuletzt wurden von jedem Reaktionsgefäß 2 \times 100 μl als Duplikate auf eine 96-Lochplatte gegeben und die Absorption bei 620 nm mit dem ELISA-Plattenlesegerät gemessen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte analog zum Kollagen-Assay (siehe vorheriges Kapitel).

2.2.4 Bestimmung der Expression gewebespezifischer Markergene

Da die Differenzierung von Zellen mit der Sekretion spezifischer Proteine einhergeht, kann diese auf genetischer Ebene durch die Expression spezifischer Markergene nachgewiesen werden. Für diesen Nachweis werden die zu untersuchenden Zellen zunächst lysiert, um die RNA zu isolieren. Aus dieser RNA wird dann mittels reverser Transkription komplementäre DNA (cDNA) generiert, welche dann in der Real-Time (Echtzeit) Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) zur Analyse der Genexpression eingesetzt wird.

2.2.4.1 Isolierung von RNA

Das hier verwendete Verfahren zur Isolierung von RNA basiert auf der selektiven Bindungseigenschaft einer Silika-Membran in Kombination mit der Mikrozentrifugationstechnologie. Biologische Proben werden zunächst in einem stark denaturierenden, RNase-hemmenden Guanidinthiocyanat-Puffer lysiert. Ein darauffolgendes ethanolhaltiges Salz-Puffersystem ermöglicht es der RNA an die Membran zu binden, während alle anderen kontaminierenden Stoffe mittels Zentrifugation gewaschen werden. Zuletzt wird die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus undifferenzierten Zellen, Zellen der adipogenen und osteogenen Differenzierung, hochdichten Zellkugeln der chondrogenen Differenzierung sowie aus Nativgeweben wie Knorpel, Fett und Knochen als Kontrollen wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, D) verwendet. Die Anwendung des Kits erfolgte nach Herstellerprotokoll. Nur aus den Ansätzen mit humanen Zellen sowie aus humanem Nativgewebe wurde RNA isoliert. Zellen in 6-Lochplatten mussten zunächst mit 700 µl 1 x 0,25 % Trypsin-EDTA für 5 min zum Ablösen inkubiert werden. Die Trypsinisierung wurde dann mit 700 µl Expansionsmedium gestoppt, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren der Suspension vom Boden abgelöst und diese dann in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Diese Gefäße wurden anschließend für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Auf die entstandenen Zellpellets wurden nun 350 µl Guanidinthiocyanat-Lysepuffer gegeben, diese resuspendiert und die Reaktionsgefäße über Nacht bei 37° C im Brutschrank zur Lyse der Zellen inkubiert. Kleine Stücke des zuvor zerkleinerten Nativgewebes sowie hochdichte Zellkugeln wurden dann ebenfalls in Reaktionsgefäße gegeben und mit 700 µl Guanidinthiocyanat-Lysepuffer versehen. Die Lyse der Gewebestücke erfolgte ebenfalls über Nacht bei 60° C im Schüttelinkubator mit rotierenden Bewegungen. Am nächsten Tag wurden nicht vollständig lysierte Gewebestücke und hochdichte Zellkugeln in QIAshredder-Säulchen mit 2 ml-Auffangröhrchen gegeben und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Zu diesen aufgefangenen Durchflüssen sowie zu den vollständig lysierten Gewebestücken und Zellpellets wurde dann 1 Volumen 70%iger Ethanol reinst zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Nachfolgend wurden von jedem Lysat 700 µl auf ein RNeasy Mini Spin-Säulchen mit 2 ml-Auffangröhrchen gegeben, für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und die Durchflüsse verworfen. Im Anschluss folgten dann 3 Waschschrte. Der erste Schritt bestand aus einer Zugabe von 700 µl ethanolhaltigen Guanidinthiocyanat-Puffer, einer Zentrifugation für 15 sec bei 10.000 rpm und dem Verwerfen der Durchflüsse. Der zweite Schritt war mit dem ersten identisch, bis auf die Zugabe von 500 µl ethanolhaltigen Salz-Waschpuffer anstatt ethanolhaltigen Guanidinthiocyanat-Puffer. Der dritte und letzte Schritt war mit dem zweiten identisch, bis

auf eine Zentrifugation für 2 min anstatt 15 sec. Alle RNeasy Mini-Spin-Säulchen wurden danach auf frische 2 ml-Auffangröhrchen gesteckt und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert um Pufferreste vollständig zu entfernen. Im Anschluss wurden die Säulchen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße gesteckt, um darin die RNA aufzufangen. Hierfür wurden auf die Membran jedes RNeasy Mini Spin-Säulchens 40 µl RNase-freies Wasser gegeben und diese für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. RNase-freies Wasser wurde aus 1 ml Diethylpyrocarbonat (Sigma-Aldrich Corporation), gelöst in 1 l destilliertem Wasser, hergestellt. Die RNA war in den aufgefangenen Durchflüssen in den Reaktionsgefäßen enthalten. Sie wurde entweder sofort für die reverse Transkription zu cDNA verwendet oder bei -80° C eingefroren.

2.2.4.2 Generierung von komplementärer DNA

Aus der isolierten RNA ist es nun möglich, cDNA mittels reverser Transkription zu generieren. Bei diesem Verfahren wird mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase zu jedem vorhandenen RNA-Strang ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Hierfür wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation) verwendet. Der dazugehörige High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix beinhaltet alle für die Erststrangsynthese der cDNA-Synthese notwendigen Reaktionskomponenten. Hierzu gehören z. B. reverse Transkriptase, oligomerische deoxy-Thymin-Nukleotide, Random Primer, Desoxynukleotidtriphosphate und Magnesiumchlorid. Die RNA muss diesem Master Mix separat zugegeben werden.

Zu jeder RNA-Probe wurden High Capacity RNA-to-cDNA MasterMix und RNase-freies Wasser in den in Tabelle 8 angebenen Mengen zugegeben und alle Komponenten durch Verwirbeln miteinander vermischt. Alle Reaktionsansätze wurden als Triplikate angesetzt. 60 µl eines jeden Reaktionsansatzes wurden in 3 gleichen Teilen á 20 µl auf 150 µl-Reaktionsgefäße (MicroAmp® Fast Reaction Tubes with Cap, Life Technologies Corporation) verteilt. Diese wurden dann in ein RT-PCR-Gerät (StepOnePlus® Real Time PCR System, Life Technologies Corporation) gegeben und mit Hilfe der zugehörigen Software (StepOne® Software, Version 2.2, Life Technologies Corporation) das entsprechende Programm für die cDNA Synthese gestartet.

Tabelle 8: Reaktionsansatz je Probe für die reverse Transkription

Komponente	1 Reaktionsansatz	3 Reaktionsansätze
RNA (1 pg bis 1 µg)	8 µl	24 µl
RNA to cDNA-MasterMix	4 µl	12 µl
RNase-freies Wasser	8 µl	24 µl
Σ	20 µl	60 µl

Der durchlaufene Programm- und Temperaturverlauf war 25° C für 10 min, 42° C für 30 min, 95° C für 10 min und 4° C für 10 min. Nach diesem Ablauf konnten die zuvor aufgeteilten Ansätze derselben Probe wieder in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vereinigt werden. Es folgte eine photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration von jeder Probe. Je Probe wurden hierfür 3 µl zusammen mit 147 µl RNase-freies Wasser in Messküvetten gegeben und der cDNA-Gehalt am Photometer gemessen. Als Reagenzleerwert dienten 150 µl RNase-freies Wasser. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden alle Proben durch Verdünnen mit RNase-freiem Wasser auf eine cDNA-Konzentration von 50 ng/µl eingestellt. Die verdünnte cDNA wurde entweder sofort für die RT-PCR weiter verwendet oder bei -20° C eingefroren.

2.2.4.3 Genexpressionsanalyse

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1984 von Kary B. Mullis entwickelt (Mullis, 1987). Sie ist eine Methode zur Vervielfältigung kurzer, definierter DNA-Fragmente mit Hilfe eines hitzestabilen Enzyms, der Taq-Polymerase. Eine PCR besteht aus 25 bis 50 Zyklen, die in einem vollautomatisierten Thermocycler durchgeführt wird, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht. Schritt 1 besteht aus der Denaturierung, in dem die Doppelstrang-cDNA auf 96° C erhitzt wird, um die von Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehaltenen Stränge zu trennen. Im 2. Schritt, der Primerhybridisierung, wird die Temperatur auf 55 bis 60° C gesenkt, um die Anheftung von Primern an die DNA-Einzelstränge zu ermöglichen. Der letzte Schritt besteht aus der Elongation, in dem die Polymerase am 3'-Ende des angehefteten Primers den komplementären Strang bei 72° C synthetisiert. Das somit entstehende PCR-Produkt ist ein Doppelstrang DNA-Fragment, das zur einen Hälfte aus dem alten Matrixstrang und zur anderen Hälfte aus dem neu synthetisierten, komplementären Strang besteht. Durch mehrfache Wiederholung dieser drei Schritte mit jedem Zyklus erfolgt eine exponentielle Anreicherung des gewünschten Fragments.

Die TaqMan® Two-Step qRT-PCR-Analyse (Life Technologies Corporation) basiert auf dem Prinzip der PCR. Genspezifische Primer heften an cDNA. Zwischen den Primern befindet sich die Bindestelle für eine sequenzspezifische Gensonde. Diese ist an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und am 3'Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert, da der qRT-PCR-Ansatz mit Laserstrahlen der Wellenlänge 488 nm bestrahlt wird. Ist die Sonde intakt, nimmt der Quencher die komplette Anregungsenergie des Reporters auf und strahlt diese in einer höheren Wellenlänge wieder ab. Dabei wird kein Fluoreszenz-Signal registriert (siehe Abbildung 5 A). Beim Aufbau des komplementären Strangs durch die DNA-Polymerase wird die Sonde erreicht und hydrolysiert (siehe Abbildung 5 B). Während der Synthese des PCR-Produkts wird somit

gleichzeitig die Sonde fragmentiert (siehe Abbildung 5 C). Dadurch werden Reporter und Quencher räumlich getrennt und es entsteht ein ansteigendes Fluoreszenzsignal des Reporters (siehe Abbildung 5 D).

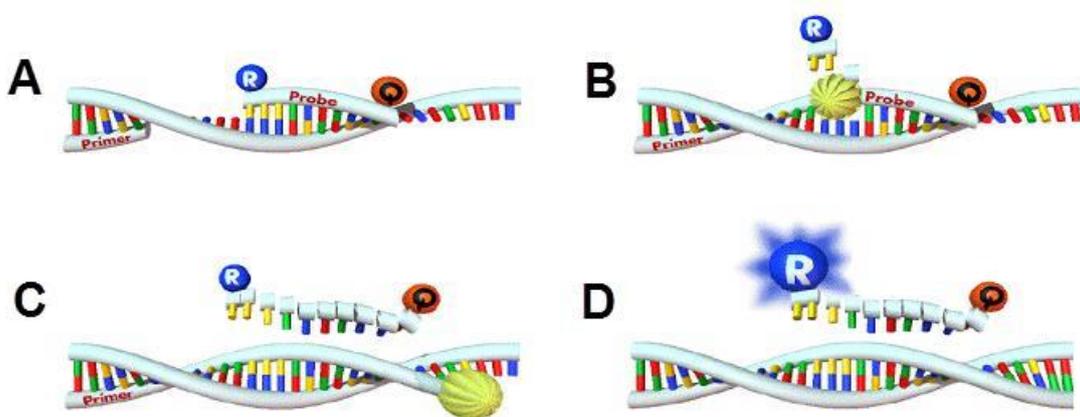


Abbildung 5: Degradierung der Gensonden bei der TaqMan® qRT-PCR. TaqMan®-Gensonde (Engl.: Probe), Reporter (R), Quencher (Q), (Quelle: Schild, 1998). A: zwischen den Bindungsstellen der spezifischen Primer heftet die Gensonde an das DNA-Fragment. Während der Laserbestrahlung nimmt der Quencher die komplette Anregungsenergie des Reporters auf. B: Durch die Synthese des Komplementärstrangs wird die Gensonde hydrolysiert. C: Die Gensonde wird vollständig fragmentiert. D: Reporter und Quencher sind voneinander getrennt und das Fluoreszenzsignal des Reporters wird registriert.

Durch die Unterstützung spezieller Software ist es möglich, die Genamplifikation in der Form von ansteigenden Fluoreszenzsignalen in Echtzeit zu verfolgen. Der Ausgabewert der Genexpression ist der sogenannte C_T -Wert (cycle threshold). Dieser entspricht dem Zyklus ab dem das Fluoreszenzsignal stärker als das Hintergrundsignal ist. Je niedriger der C_T -Wert, desto höher die Genexpression. Um die Expression spezifischer Markergene zu untersuchen, wurde in der RT-PCR die zuvor generierte cDNA als Vorlage eingesetzt. Zusätzlich wurde die Expression eines sogenannten Haushaltsgens untersucht, auf welches die Expression der restlichen untersuchten Gene bezogen wurde. Ein Haushaltsgen wird unabhängig vom Gewebe und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert.

Zur Analyse der Expression unterschiedlicher Markergene wurde die TaqMan® Two-Step qRT-PCR-Analyse (Life Technologies Corporation) angewendet. Zu jeder cDNA-Probe wurden TaqMan® Gene Expression Master Mix, Primer plus TaqMan® Gensonde (beide: Life Technologies Corporation) und RNase-freies Wasser in den in Tabelle 9 angebenen Mengen zugegeben und alle Komponenten durch Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt. Die für das Multidifferenzierungspotential untersuchte Expression spezifischer Markergene wurde mit den in Tabelle 10 aufgelisteten genspezifischen Primern plus TaqMan® Gensonden untersucht. Alle Reaktionsansätze wurden als Duplikate angesetzt.

Tabelle 9: Reaktionsansatz je cDNA-Probe für die RT-PCR

Komponente	1 Reaktionsansatz
cDNA (100 ng)	2 µl
TaqMan® Gene Expression Master Mix	5 µl
Primer plus TaqMan® Gensonde	0,5 µl
RNase-freies Wasser	2,5 µl
Σ	10 µl

Tabelle 10: Genspezifische Primer plus TaqMan® Gensonden für Fett, Knochen und Knorpel

Name des gewebespezifischen Markergens	Kategorie	Gendatenbank-Nr.
Aggrecan (ACAN)	C	NM_001135.3
Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL)	K	NM_000478.4
Bone gamma-carboxyglutamate protein (BGLAP)	K	NM_199173.4
Cartilage acidic protein 1 (CRTAC)	C	NM_001206528.2
Collagen, type II, alpha 1 (COL2A1)	C	NM_001844.4
Fatty acid binding protein 4, adipocyte (FABP4)	F	NM_001442.2
Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)	H	NM_001256799.1
Leptin (LEP)	F	NM_000230.2
Lipoprotein lipase (LPL)	F	NM_000237.2
Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)	K	NM_001015051.3
SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9)	C	NM_000346.3

Knorpel (C), Fett (F), Haushaltsgen (H), Knochen (K)

Die Reaktionsansätze wurden auf einer 96-Lochplatte (0,1 ml Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, Life Technologies Corporation) verteilt, welche anschließend mit Klebefolie (Sarstedt AG & Co) versiegelt und in das RT-PCR-Gerät gegeben wurde. Nach Starten der zugehörigen Software und dem Aufrufen des entsprechenden Programms wurde die RT-PCR-Analyse initiiert. Der Programm- und Temperaturablauf hierfür war zu Beginn 50° C für 2 min und 95° C für 10 min gefolgt von 40 sich wiederholenden Zyklen aus 95° C für 15 sec und 60° C für 1 min. Abschließend waren noch 4° C für 10 min vorgesehen. Die Software gab die Genexpression in C_T -Werten an, aus welchen die Expression in Relation zum Haushaltsgen berechnet wurde. Lag das Fluoreszenzsignal einer Probe durchgehend unterhalb des Hintergrundsignals, dann konnte für diese von der Software kein C_T -Wert ermittelt werden ($C_T = \text{undetermined}$). In diesem Fall wurde der C_T -Wert der höchsten verwendeten Zykluszahl von 40 gleichgesetzt (Juusola & Ballantyne, 2007; Goni et al., 2009; Ragusa et al., 2010; Perkins et al., 2012; Dasgupta et al., 2014; McCall et al., 2014). Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte nach der von Livak & Schmittgen (2001) beschriebenen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode. Hierfür wurde zunächst die Expression der spezifischen Markergene in jeweils differenzierten und undifferenzierten Zellen auf die Expression des Haushaltsgens

in denselben Zellen nach der Formel $\Delta C_T = C_T\text{-Markergen} - C_T\text{-Haushaltsgen}$ normiert. Die normierte Genexpression in differenzierten Zellen ($\Delta C_T\text{-differenzierte Zellen}$) konnte dann auf die in undifferenzierten Zellen ($\Delta C_T\text{-undifferenzierte Zellen}$) nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T} = \Delta C_T\text{-differenzierte Zellen} - \Delta C_T\text{-undifferenzierte Zellen}$ bezogen werden. Die erhaltene relative Genexpression wurde als sogenannter „fold change“ in Diagrammen mit einer Skalierung der y-Achse im logarithmischen Maßstab zur Basis 2 dargestellt. Dieser Wert gibt an, um ein wievielfaches ein untersuchtes Gen in differenzierten Zellen im Verhältnis zu undifferenzierten Zellen höher oder niedriger exprimiert wird.

2.3 Chondrogene Differenzierung von Fettgewebstammzellen in Hydrogelen

Um einen geeigneten Ansatz für die Generierung von zellbesiedeltem Knorpelersatzgewebe zu erzielen, wurden zunächst unterschiedliche Hydrogelkombinationen aus Kollagen Typ I, Agarose, Fibrin und Hyaluronsäure als Trägermaterialien ausgewählt. Diese wurden dann mit Fettgewebstammzellen von 4 Spendern (Spender Nr. 7, 8, 12 und 13) besiedelt und anschließend mit Kombinationen aus den chondrogenen Wachstumsfaktoren TGF- β 3, BMP-6 und IGF-I *in vitro* differenziert. Nachfolgend wurde die Differenzierung der ASC mittels histologischer, immunhistochemischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden untersucht (siehe Abbildung 6).

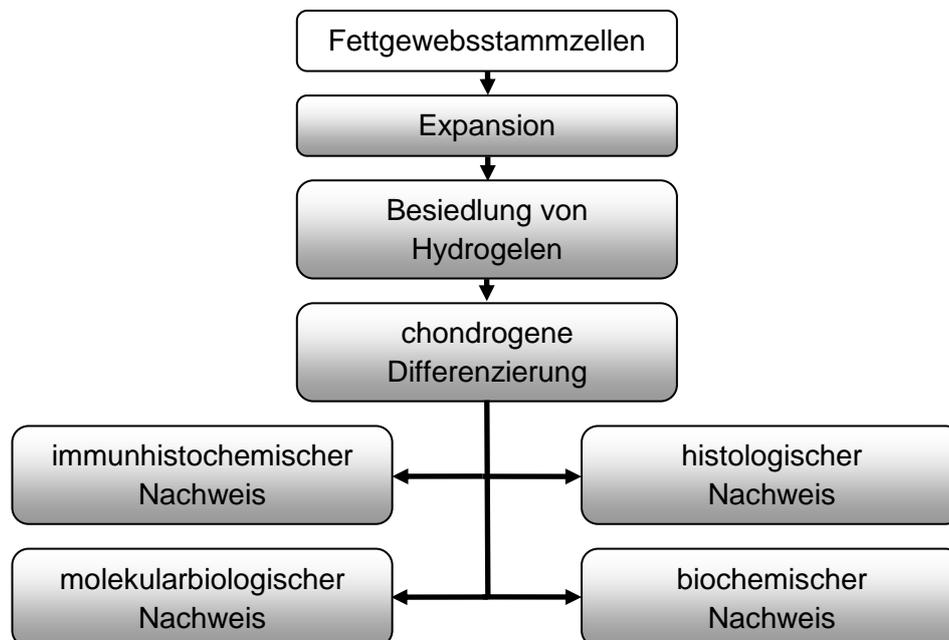


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der chondrogenen Differenzierung von Fettgewebstammzellen in Hydrogelen. ASC wurden in Hydrogelen zu phänotypähnlichen Knorpelzellen differenziert. Die Nachweise der Differenzierung erfolgten histologisch, immunhistochemisch, molekularbiologisch und biochemisch.

2.3.1 Herstellung und Besiedelung von Hydrogelen

Die einzelnen Komponenten, die für die Herstellung von Hydrogelkombinationen notwendig waren, mussten zunächst vorbereitet werden. Tiefgefrorene Kollagengel-Lösung (Kollagen-MS $6 \pm 0,5$ mg/ml, Amedrix GmbH, Esslingen, D) wurde zusammen mit Neutralisationslösung (2GNL auf Basis von DMEM, Amedrix GmbH) und Aprotinin-Lösung (500 KIE/ml, Sigma-Aldrich Corporation) im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und dann bei Raumtemperatur gehalten. Je 100 mg gefriergetrocknetes Fibrinogen (Sigma-Aldrich Corporation) wurden in 1 ml Aprotinin-Lösung gelöst, steril filtriert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Lyophilisiertes Thrombin S (5 IE/ml, Tissucol®-Kit 1,0 Immuno Fibrinkleber, Baxter AG, Wien, A) in Lösung wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. 250 mg gefriergetrocknete Hyaluronsäure (Sigma-Aldrich Corporation) wurden in 15 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (B. Braun Melsungen AG) in einem 50 ml Falcon-Röhrchen bei 37°C für 60 min im Schüttelinkubator gelöst. Je 3 g Agarose Typ VII (low melting, Sigma-Aldrich Corporation) wurden in 100 ml destilliertem Wasser durch Aufkochen in einer Mikrowelle (Sharp Electronics, Hamburg, D) in Lösung gebracht. Diese 3 %ige Agarose-Lösung wurde anschließend in einem Autoklaven (SHP Steriltechnik AG, Detzel, D) sterilisiert und nach ihrem Erkalten erneut in der Mikrowelle durch Erhitzen verflüssigt. Im Wasserbad wurde die Agaroselösung bei 37°C flüssig gehalten.

Fettgewebstammzellen der Spender wurden nach Kapitel 2.1.2 abgelöst, gezählt, zentrifugiert und in Expansionsmedium so verdünnt, dass die Zelldichte 1 Mio pro ml betrug. Diese Zellen wurden zuvor bis zur benötigten Menge und maximal bis zur Passage 4 expandiert. Von jedem Spender wurden die resuspendierten Zellen dann in 2 gleichen Teilen auf neue 15 ml Falcon-Röhrchen verteilt, zentrifugiert und dann die Überstände verworfen. Die eine Hälfte der Zellen wurde im Mischungsverhältnis 1 Mio Zellen/167 μl aufgetauter Neutralisationslösung und die andere Hälfte der Zellen im Mischungsverhältnis 1 Mio Zellen/83 μl 0,9 %ige Natriumchlorid-Lösung resuspendiert.

Aus den so vorbereiteten Komponenten wurden 6 unterschiedliche, in Tabelle 11 angegebene, Hydrogelkombinationen in 48-Lochplatten (Nunclon® Surface, Nunc A/S, Roskilde, DK) hergestellt. Es wurde je ein Ansatz pro Well durch zügiges Vermischen sowie Auf- und Abpipettieren der Gelkomponenten hergestellt. Die Zugabe der einzelnen Gelkomponenten erfolgte für jede Gelkombination in den in Tabelle 11 angegebenen Mengen und Reihenfolge. Die Herstellung und Besiedlung der Gele erfolgte somit zeitgleich.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Hydrogelkombinationen

Gelkombination	Komponenten	Menge	Endkonzentration in Gelkombination
Kollagen-Agarose	Neutralisationslösung mit Zellen	50 μ l	-
	Kollagengel-Lösung	100 μ l	3 mg Kollagen/ml
	Agarosegel-Lösung	150 μ l	1,5 % Agarose
Kollagen-Hyaluronsäure	Neutralisationslösung mit Zellen	50 μ l	-
	Kollagengel-Lösung	100 μ l	3 mg Kollagen/ml
	Hyaluronsäuregel-Lösung	150 μ l	8,4 mg Hyalurons./ml
Kollagen-Fibrin	Neutralisationslösung mit Zellen	50 μ l	-
	Thrombin S-Lösung	75 μ l	-
	Fibrinogen-Aprotinin-Lösung	75 μ l	25 mg Fibrin/ml
	Kollagengel-Lösung	100 μ l	3 mg Kollagen/ml
Agarose-Hyaluronsäure	Natriumchlorid-Lösung mit Zellen	25 μ l	-
	Agarosegel-Lösung	150 μ l	1,5 % Agarose
	Hyaluronsäuregel-Lösung	150 μ l	8,4 mg Hyalurons./ml
Agarose-Fibrin	Natriumchlorid-Lösung mit Zellen	25 μ l	-
	Thrombin S-Lösung	75 μ l	-
	Fibrinogen-Aprotinin-Lösung	75 μ l	25 mg Fibrin/ml
	Agarosegel-Lösung	150 μ l	1,5 % Agarose
Fibrin-Hyaluronsäure	Natriumchlorid-Lösung mit Zellen	25 μ l	-
	Thrombin S-Lösung	75 μ l	-
	Fibrinogen-Aprotinin-Lösung	75 μ l	25 mg Fibrin/ml
	Hyaluronsäuregel-Lösung	150 μ l	8,4 mg Hyalurons./ml

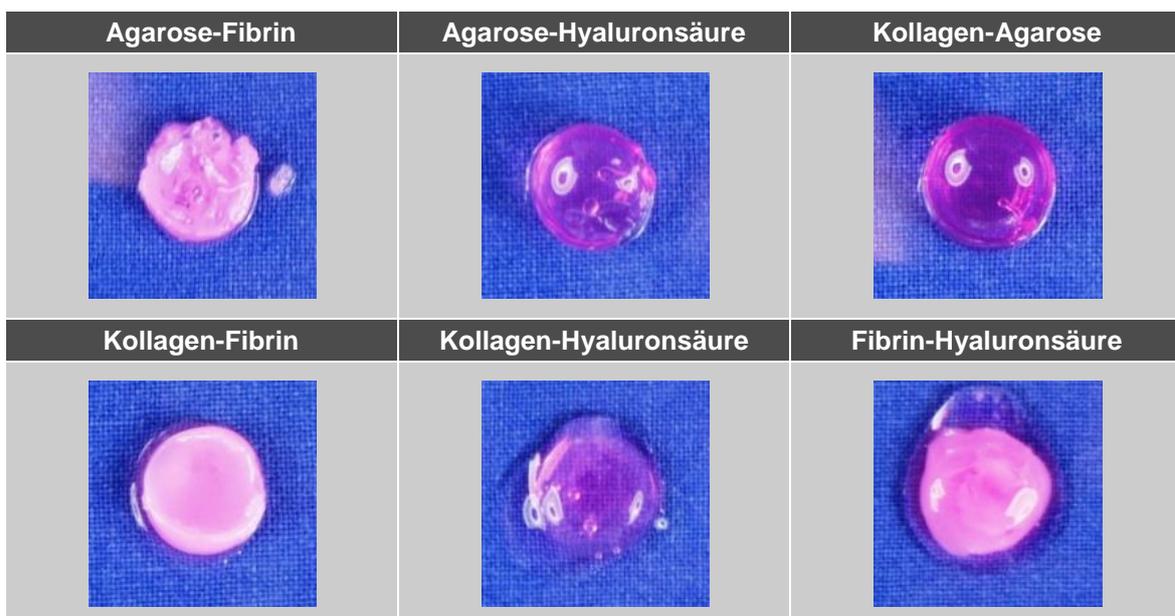


Abbildung 7: Mit Fettgewebstammzellen besiedelte Hydrogelkombinationen nach Verfestigung im Brutschrank (Geldurchmesser = 15 mm).

Das Endvolumen der fertigen Gele (siehe Abbildung 7) betrug 300 bis 325 μl und die Zelldichte in den Gelen war 1 Mio/ml. Zur Verfestigung der Gele wurden die Lochplatten bei 37° C für 20 min in den Brutschrank gegeben. Je Spender wurden von jeder Hydrogelkombination insgesamt 3 Ansätze pro chondrogenes Differenzierungsmedium hergestellt. Von diesen 3 Ansätzen war je 1 Ansatz für die histologische/immunhistochemische, biochemische und molekularbiologische Untersuchung vorgesehen.

2.3.2 Induktion der chondrogenen Differenzierung

Nach der Verfestigung der zellbesiedelten Hydrogelkombinationen wurde die chondrogene Differenzierung durch Zugabe von chondrogenem Differenzierungsmedium über 14 Tage bei 37° C und 5 % CO₂ *in vitro* induziert. Dieses Medium wurde nach der Beschreibung in Tabelle 5 angesetzt und für die chondrogene Differenzierung in dieser Form verwendet. Zusätzlich wurden aus diesem Medium durch die Zugabe der chondrogenen Wachstumsfaktoren knochenmorphogenetisches Protein 6 (BMP-6, Promocell GmbH, Heidelberg, D) und Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor I (IGF-I, Sigma-Aldrich Corporation) zwei weitere chondrogene Differenzierungsmedien hergestellt. Dem Medium aus Tabelle 5 wurden BMP-6 und IGF-I in den in Tabelle 12 angegebenen Mengen zugegeben.

Tabelle 12: Zusätzliche chondrogene Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktor	Stockkonzentration	Menge	Endkonzentration
BMP-6	10 ng/ μl	50 μl	10 ng/ml
IGF-I	300 ng/ μl	50 μl	300 ng/ml

Somit wurden für die chondrogene Differenzierung 3 unterschiedliche Medien mit folgenden chondrogenen Wachstumsfaktoren verwendet: TGF- β 3, TGF- β 3 plus BMP-6 und TGF- β 3 plus IGF-I. Die chondrogene Differenzierung erfolgte in den 48-Lochplatten in denen sich die frisch hergestellten zellbesiedelten Gelkombinationen befanden. Jedem Gel wurden 700 μl Differenzierungsmedium zugegeben und der Mediumwechsel erfolgte jeweils montags, mittwochs und freitags.

2.3.3 Nachweis der chondrogenen Differenzierung

2.3.3.1 Aufbereitung der Ansätze

Am Ende der Induktionszeit wurde bei allen Gelen zunächst das Medium abgesaugt. Gele, die für die histologische Untersuchung bestimmt waren, wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, entsprechend aufbereitet.

Für die biochemische Untersuchung erfolgte die Aufbereitung der Gele wie bereits in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

Zur Untersuchung der Expression knorpelspezifischer Markergene wurden die Gele, wie bereits in Kapitel 2.2.4 beschrieben, aufbereitet.

2.3.3.2 Histologischer/Immunhistochemischer Nachweis

Neben der Alcianblau-, Safranin-O- und Pikrosiriusrot-Färbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung (siehe Kapitel 2.2.2) wurde zusätzlich ein immunhistochemischer Nachweis der chondrogenen Differenzierung mit knorpelspezifischen Antikörpern verwendet. Diese Immunperoxidase-Prozedur zur Lokalisation von Antigenen und anderen Markern wurde ursprünglich 1981 von Hsu und Mitarbeitern beschrieben (Hsu et al., 1981). In diesem Verfahren, das auch als ABC-Methode bezeichnet wird, werden biotinylierte Antikörper sowie bereits gebildete Komplexe aus Avidin und einem biotinylierten Enzym verwendet. Durch die hohe Affinität von Avidin für Biotin ist eine Bindung zwischen diesen beiden Substanzen irreversibel. Der erste Schritt dieses Verfahrens besteht aus einer Inkubation mit einem Erstantikörper gegen das gesuchte Antigen. Durch die Zugabe des Biotin-markierten Zweitantikörpers gelangt das Biotin an den Erstantikörper. Der Komplex aus Avidin und dem biotinylierten Enzym, der ABC-Komplex, wird danach zugegeben und bindet an den Biotin-markierten Zweitantikörper. Zuletzt wird das Antigen durch Inkubation mit einem Enzymsubstrat durch Braunfärbung lokalisiert.

Hierfür wurden Gewebeschnitte auf Objektträgern zunächst mit einem Fettstift (PAP Pen Liquid Blocker, Science Services GmbH, München, D) umrandet, mit Blocking-Lösung (1 x PBS plus 10% BSF) zur Blockierung von unspezifischen Bindungen versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 3 min mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid (Merck KGaA) inkubiert und dann 2 x mit 1 x PBS gewaschen. Der Erstantikörper wurde dann 1:100 bis 1:1000 mit 1 x PBS verdünnt, 100 µl dieser Verdünnung auf jeden Objektträger pipettiert und bei 4° C über Nacht inkubiert. Als Erstantikörper wurden Anti-Kollagen Typ II (Mouse Anti-Collagen Type II Antibody, clone 6B3, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), Anti-Aggrekan (Mouse Anti-Aggrekan, Novus Biologicals, LLC, Littleton, CO, USA) und Anti-SOX9 (Anti-SOX9 antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich Corporation) verwendet (siehe Tabelle 13). Am Tag danach wurden die Objektträger 3 x mit 100 µl 1 x PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit dem 1:5000 bis 1:10.000 verdünnten und entsprechendem Biotin-markierten Zweitantikörper (Anti-Mouse IgG-Biotin antibody oder Anti-Rabbit IgG-Biotin antibody, Sigma-Aldrich Corporation) bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Antikörper-Spezies	Antikörperart	Isotyp
Anti-Kollagen Typ II	Anti-Human (Mouse monoclonal)	Erstantikörper	IgG
Anti-Aggrekan	Anti-Human (Mouse monoclonal)	Erstantikörper	IgG
Anti-SOX9	Anti-Human (Rabbit monoclonal)	Erstantikörper	IgG
Biotin-Antikörper	Anti-Mouse	Zweitantikörper	IgG
Biotin-Antikörper	Anti-Rabbit	Zweitantikörper	IgG

Nach der Inkubation wurden die Objektträger 2 x mit 100 µl 1 x PBS und 1 x mit 100 µl destilliertem Wasser gewaschen. Nachfolgend wurden 100 µl 1:1000 in 1 x PBS verdünnte Streptavidin-Peroxidase (Sigma-Aldrich Corporation) auf die Proben gegeben, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und der vorherige Waschschriff (2 x 1 x PBS und 1 x destilliertes Wasser) wiederholt. Dann wurden 30 µl 10 x DAB Liquid Chromogen mit 1 ml DAB Liquid Buffer (3,3'-Diaminobenzidine [DAB] Liquid Substrate System, Sigma-Aldrich Corporation) vermischt, 100 µl dieser Mischlösung auf jede Probe gegeben und für 3 bis 10 min inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität durch Braunfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von destilliertem Wasser gestoppt. Die Kerngegenfärbung erfolgte durch rasches Eintauchen der Objektträger in Nuclear Fast Green-Lösung (Sigma-Aldrich Corporation) und nachfolgendem Waschen mit destilliertem Wasser für 1 min. Bei der Färbung mit Anti-SOX9 wurde die Kernfärbung ausgelassen.

2.3.3.3 Biochemischer Nachweis

Der DNA-, Kollagen- und Glykosaminoglykangehalt der Hydrogele wurde wie bereits in Kapitel 2.2.3 beschrieben, bestimmt.

2.3.3.4 Expression knorpelspezifischer Markergene

Wie bereits in Kapitel 2.2.4 beschrieben, wurde aus den Gelen zunächst die RNA isoliert und aus dieser cDNA generiert, welche für die RT-PCR verwendet wurde. Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurde die Expression knorpelspezifischer Markergene mit folgenden in Tabelle 14 einsehbaren genspezifischen Primern plus TaqMan® Gensonden (alle: Life Technologies Corporation) untersucht. Die Auswertung der Genexpression erfolgte ebenfalls nach Kapitel 2.2.4.

Tabelle 14: Genspezifische Primer plus TaqMan® Gensonden für Knorpel

Name des knorpelspezifischen Markergens	Kategorie	Gendatenbank-Nr.
Aggrecan (ACAN)	C	NM_001135.3
Cartilage acidic protein 1 (CRTAC)	C	NM_001206528.2
Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)	C	NM_000095.2
Collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)	C	NM_000088.3
Collagen, type II, alpha 1 (COL2A1)	C	NM_001844.4
Collagen, type X, alpha 1 (COL10A1)	C	NM_000493.3
Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)	H	NM_001256799.1
SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9)	C	NM_000346.3

Knorpel (C), Haushaltsgen (H)

2.4 Untersuchung zellbesiedelter Hydrogele im *in vitro*- und im *in vivo*-Knorpeldefektmodell

Bislang wurden unterschiedliche zellbesiedelte Hydrogelkombinationen generiert, mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren *in vitro* differenziert und anschließend histologisch, biochemisch und molekularbiologisch untersucht. Im nächsten Schritt wurden nun einige dieser untersuchten Hydrogelkombinationen ausgewählt und zur Füllung von Knorpeldefekten in einem *in vitro*- und in einem *in vivo*-Knorpeldefektmodell eingesetzt. Für das *in vitro*-Modell wurden die Hydrogele mit Fettgewebstammzellen von 4 Spendern (Spender Nr. 7, 8, 12 und 13) besiedelt, während für das *in vivo*-Modell ASC von 6 Spendertieren (Tiere Nr. 12, 37, 44, 47, 5018 und 5084) für die Besiedlung der Hydrogele verwendet wurden. Die anschließende Untersuchung der chondrogenen Differenzierung der eingesetzten zellbesiedelten Füllmaterialien in den Knorpeldefekten, deren Integration in das native Knorpelgewebe sowie deren mögliche Defektdeckung erfolgte histologisch und immunhistochemisch.

2.4.1 *In vitro*-Knorpeldefektmodell

Als Ausgangsmaterial für die Knorpeldefekte diente natives Knorpelgewebe aus Schweineohren, welche vom Tier-OP des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin der Universität Würzburg nach der Euthanasierung von Schweinen bezogen wurden. Die noch frischen Ohren wurden zunächst mit Zellwaschpuffer mehrmals gewaschen und dann mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden diese unter sterilen Bedingungen von beiden Seiten mit einem Skalpell gehäutet und der Knorpel freigelegt. Für die Generierung von Knorpeldefekten wurde nur Knorpel ab einer Dicke von etwa 1,5 mm verwendet. Aus den großflächigen Knorpelstücken wurden dann mehrere in etwa 1,5 cm x 1,5 cm große Stücke geschnitten. Diese wurden dann zum Waschen in ein mit Zellwaschpuffer gefülltes 100 ml-Becherglas (Schott AG) gegeben. Im nächsten Schritt wurde jedes Knorpelstück in einer sterilen 60 mm-Plastikpetrischale

(Greiner Bio-One GmbH) mit einem Skalpell wenn nötig in 2 gleiche Teile geschnitten und den Dimensionen der Wells einer 24-oder 48-Lochplatte angepasst. In jedes dimensionierte Stück wurden nun mit einer sterilen 4 mm-Stanze (Gyrus Medical GmbH, Tuttlingen, D) ein bis zwei Defekte gestanzt. In die Lochplatten wurde pro Well ein Knorpelstück mit Defekt gegeben. Die Defektfüllung folgte dann im nächsten Schritt in zwei verschiedenen Varianten. Zur Füllung wurden für beide Varianten die zellbesiedelten Hydrogelkombinationen Kollagen-Fibrin und Fibrin-Hyaluronsäure verwendet, deren Herstellung in Kapitel 2.3.1 beschrieben wurde. Zusätzlich wurde analog zu den anderen Gelkombinationen eine weitere zellbesiedelte Hydrogelkombination aus Kollagen, Fibrin und Hyaluronsäure nach Tabelle 15 hergestellt. Das Gelendvolumen betrug ebenfalls 300 μl . Je Spender wurden von jeder Hydrogelkombination insgesamt 3 Ansätze pro chondrogenes Differenzierungsmedium hergestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der zusätzlichen Hydrogelkombination

Gelkombination	Komponenten	Menge	Endkonzentration in Gelkombination
Kollagen-Fibrin-Hyaluronsäure	Neutralisationslösung mit Zellen	33 μl	-
	Thrombin S-Lösung	50 μl	-
	Fibrinogen-Aprotinin-Lösung	50 μl	16,7 mg Fibrin/ml
	Kollagengel-Lösung	66 μl	2 mg Kollagen/ml
	Hyaluronsäuregel-Lösung	100 μl	5,6 mg Hyaluronsäure/ml

Für die erste Füllvariante der Knorpeldefekte wurden die 3 zellbesiedelten Hydrogelkombinationen nach der Herstellung zuvor für 14 Tage mit den beiden chondrogenen Differenzierungsmedien mit Kombinationen der chondrogenen Wachstumsfaktoren TGF- β 3 plus BMP-6 und TGF- β 3 plus IGF-I (siehe Kapitel 2.3.2) kultiviert. Nach der 14-tägigen Kultivierung wurden die Hydrogele in eine sterile 60 mm-Plastikpetrischale überführt und aus jedem Gel mit der 4 mm-Stanze 3 Stücke ausgestanzt. Je Knorpeldefekt wurden dann mit einer sterilen Pinzette 2 bis 3 dieser Gelstücke eingesetzt. Anschließend erfolgte eine 14-tägige Kultivierung der Knorpelstücke mit Füllungen in 24-Lochplatten mit denselben chondrogenen Differenzierungsmedien und unter gleichen Bedingungen wie bei der chondrogenen Differenzierung der zuvor eingesetzten Hydrogele. Je Well wurden anstatt 700 μl 900 μl Differenzierungsmedium verwendet.

In der zweiten Füllvariante der Knorpeldefekte wurden die 3 zellbesiedelten Hydrogelkombinationen bei der Herstellung direkt in die Defekte gefüllt. Die Verfestigung der Hydrogele fand in den Defekten statt. Die nachfolgende Kultivierung der Knorpelstücke mit Füllungen in 48-Lochplatten erfolgte mit denselben chondrogenen

Differenzierungsmedien und unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Variante. Je Well wurden 700 µl Differenzierungsmedium verwendet und die Kultivierungsdauer betrug 6 Wochen.

Nach der Kultivierungsphase wurden die Knorpelstücke mit Füllungen aus beiden Varianten entsprechend für histologische Untersuchungen (siehe Kapitel 2.3.3) verarbeitet. Der histologische und immunhistochemische Nachweis der chondrogenen Differenzierung erfolgte mit den Färbungen Alcianblau und Safranin-O (siehe Kapitel 2.2.2) bzw. mit den Antikörpern Anti-Aggrekan und Anti-Kollagen Typ II (siehe Kapitel 2.3.3).

2.4.2 *In vivo*-Knorpeldefektmodell

Für das *in vivo*-Knorpeldefektmodell wurden 6 weiße neuseeländische Kaninchen verwendet (Tiere Nr. 12, 37, 44, 47, 5018, 5084). In diesem Modell wurden nach dem „rabbit pinna punch hole model“, welches von ten Koppel et al. (2001) beschrieben wurde, Ohrmuschelknorpeldefekte in Kaninchenohren generiert. Diese wurden anschließend mit Hydrogelkombinationen, die mit autologen Fettgewebstammzellen besiedelt waren, gefüllt. Nach einem 3- und 6-wöchigem Verbleib der Hydrogelkombinationen im lebenden Tier, wurden diese aus den Kaninchenohren explantiert und histologisch untersucht.

Für die Defektfüllung wurden zunächst die Hydrogelkombinationen Kollagen-Agarose, Kollagen-Fibrin, Agarose-Hyaluronsäure, Agarose-Fibrin und Fibrin-Hyaluronsäure nach Kapitel 2.3.1 hergestellt und mit ASC von 6 Spendertieren besiedelt. Die anschließende chondrogene Vordifferenzierung erfolgte nach Kapitel 2.3.2 *in vitro* über 14 Tage mit den chondrogenen Differenzierungsmedien TGF-β3 plus BMP-6 und TGF-β3 plus IGF-I. Je Spendertier wurden von jeder Hydrogelkombination insgesamt 3 Ansätze pro chondrogenes Differenzierungsmedium hergestellt.

Alle operativen Eingriffe bei den Versuchstieren wurden von Frau PD Dr. med. Katrin Frölich und Frau Dr. rer. nat. Antje Technau mit Assistenz von Frau Petra Joa unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, wurde bei den Tieren die Narkose eingeleitet und nach Überprüfung der Narkosetiefe eine Kompresse in den Gehörgangseingang eingelegt. Dadurch wurde das Eintreten von Desinfektionslösung oder Blut in den äußeren Gehörgang verhindert. Anschließend wurden die Ohren mit Cutasept® F (Bode Chemie GmbH, Hamburg, D) steril abgewaschen und es erfolgte mit einem Skalpell (Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, J) auf der Ohrmuschelvorderseite ein Hautschnitt von 6 bis 8 cm Länge. Dieser war lateral gelegen und erfolgte zunächst auf der rechten Seite. Danach wurden Haut und Knorpelhaut vom Ohrknorpel abgeschoben und der Knorpel freigelegt. Nachfolgend

wurden dann in einer Reihe sechs 4 mm-große Defekte in ca. 5 mm Abstand zueinander mit der 4 mm-Biopsiestanze aus dem Knorpel ausgestanzt (siehe Abbildung 8 A). Um eine Verschiebung der Hydrogele möglichst zu vermeiden, wurden Knorpelhaut und Haut auf der Ohrrückseite belassen. Nach der Generierung der Defekte (siehe Abbildung 8 B) wurde mit der Defektfüllung begonnen. In den ersten Knorpeldefekt wurde eines der zuvor ausgestanzten körpereigenen Knorpelstücke zur Kontrolle wieder eingesetzt. Dies diente als Vergleich für die Integration der zellbesiedelten Hydrogelkombinationen. In den nächsten Knorpeldefekt wurde dann ein ausgestanztes 4 mm großes Gelstück aus einem der 3 zellbesiedelten Kollagen-Agarose Hydrogele eingesetzt. Mit den restlichen 4 oben genannten Hydrogelkombinationen wurde ebenfalls in dieser Weise fortgeföhrt. Die Implantation der Hydrogele erfolgte in der Reihenfolge der obigen Aufzählung.

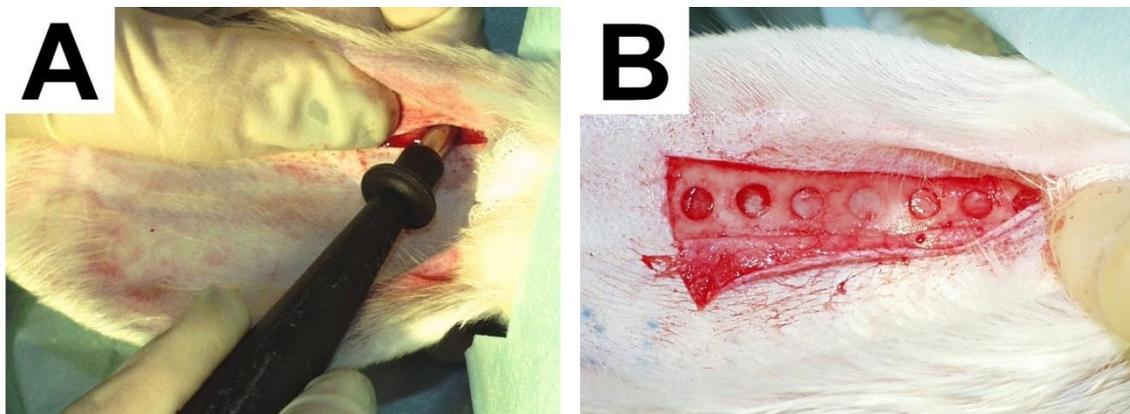


Abbildung 8: Operativer Eingriff zur Generierung von Knorpeldefekten in Kaninchenohren nach dem „rabbit pinna punch hole model“ von ten Koppel et al. (2001). A: Ausstanzen der 4 mm großen Defekte mit einer Biopsiestanze. B: Defekte nach dem Ausstanzen mit intakter Haut auf der Rückseite des Ohres zur Füllung mit zellbesiedelten Hydrogelen und körpereigenem Knorpelgewebe.

Nach dem Einsetzen der Hydrogele wurde die zu Beginn verschobene Haut über die Defekte gelegt und mit Vicryl-Nahtmaterial (Ethicon Coated Vicryl® rapide, Johnson & Johnson Medical Products GmbH, Wien, A) wieder vernäht. Die einzelnen Hydrogelkombinationen wurden mit einer Matratzennaht fixiert, um eine Verschiebung der Implantate möglichst zu vermeiden. Im Anschluss wurde die Wunde erneut desinfiziert und mit Sprühpflaster (Hansaplast® Sprühpflaster, Beiersdorf AG, Hamburg, D) versehen. Danach wurde bei identischem Vorgehen zum anderen Kaninchenohr übergewechselt. Auf diese Weise befanden sich je Tier in einen Ohr die mit TGF- β 3 plus BMP-6 vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukte und im anderen Ohr die mit TGF- β 3 plus IGF-I vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukte. Nach dem Eingriff wurden die Tiere zum Aufwachen in eine Kaninchenbox gebracht. In den folgenden Tagen wurden die Kaninchen weiter beobachtet und die Wundverhältnisse kontrolliert.

Die Entnahme der Hydrogele aus den Ohren erfolgte bei 3 Tieren nach 3 Wochen und bei den anderen 3 Tieren nach 6 Wochen. Hierfür wurde zunächst die Narkose eingeleitet. Nach Überprüfung der Narkosetiefe, Einlage einer Kompresse in den Gehörgangseingang und sterilem Abwaschen der Ohren, erfolgte ein Hautschnitt auf der Ohrmuschelvorderseite des rechten Ohres. Dabei wurden die zum Teil noch tastbaren Hydrogele unter Mitnahme des umliegenden Knorpelgewebes und der hinteren Hautbedeckung aus der Ohrmuschel mit dem Skalpell herausgeschnitten. Dieses Biopsiestück (siehe Abbildung 9 A) wurde dann mit Vicryl-Nahtmaterial markiert und in ein mit 1 x PBS gefülltes 50 ml-Falcon-Röhrchen gegeben. Nach der Blutstillung erfolgte ein zweischichtiger Wundverschluss mit Vicryl-Nahtmaterial. Die Wunde wurde anschließend erneut desinfiziert und mit Sprühpflaster versehen. Nachfolgend wurde zur Gegenseite übergewechselt, an der das Vorgehen identisch war. Die Biopsiestücke wurden entsprechend der Verarbeitung für histologische Untersuchungen zunächst in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und dann in 30%iger Glukose-Lösung inkubiert. Vor der Einbettung in Tissue Tek® OCT Compund Fixiergel wurden die großen Biopsiestücke in mehrere kleine gleichgroße Stücke geschnitten (siehe Abbildung 9 B). Da die genaue Lokalisation der Hydrogele in diesen kleinen Biopsiestücken nicht immer exakt auszumachen war, wurden diese am Kryostaten komplett geschnitten. Die Schnittdicke betrug ebenfalls 10 µm. Jeder Objektträger wurde mit 8 bis 10 Gewebeschnitten versehen. Die nachfolgende histologische Untersuchung erfolgte mit den histologischen Färbungen Alcianblau und Safranin-O (siehe Kapitel 2.2.2).

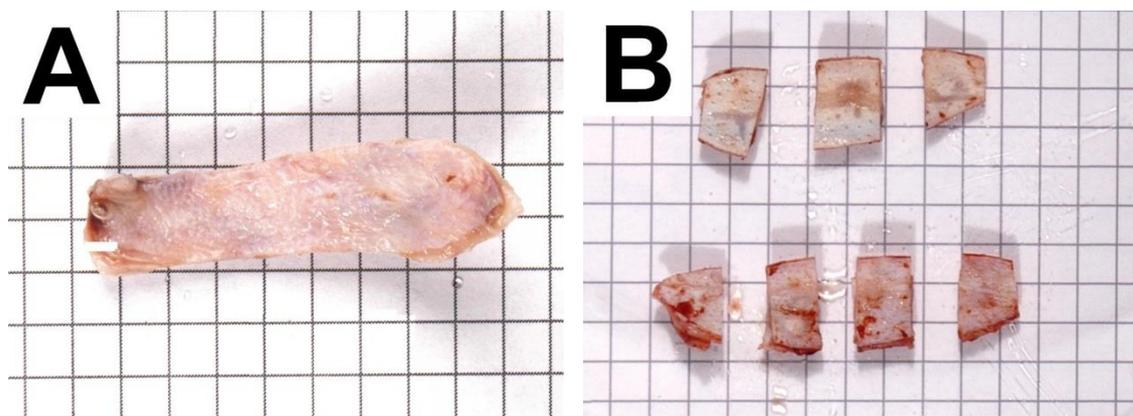


Abbildung 9: Kaninchenohrbiopsie zur Verarbeitung für die histologische Untersuchung (Ausrichtungen A und B: links proximal, rechts distal). A: Biopsiestreifen ganz. Die genauen Positionen der Hydrogele sind hier nicht mehr auszumachen. B: Biopsiestreifen nach dem Zerschneiden in kleinere Stücke, welche nachfolgend am Kryostaten komplett geschnitten wurden (1 Kästchen = 5 x 5 mm).

2.5 Einfluss der Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Biologie und Physiologie von Fettgewebstammzellen

Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (VSOP) können als Kontrastmittel für die Magnetresonanz-Bildgebung (MRT) *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden, wodurch eine Lokalisation und Verfolgung markierter Zellen ohne die Verwendung invasiver Methoden möglich ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel (VSOP 5 nm *in vitro*, Ferropharm GmbH, Teltow, D) besitzen eisenhaltige Maghemit-Kerne von 5 nm Durchmesser, welche von einer 1 bis 2 nm dicken Hülle aus monomerem Citrat umgeben sind (siehe Abbildung 10 A und B). Die Hülle verhindert ein Ausfallen der Partikel in wässriger Lösung in der Anwesenheit von starken Magnetfeldern.

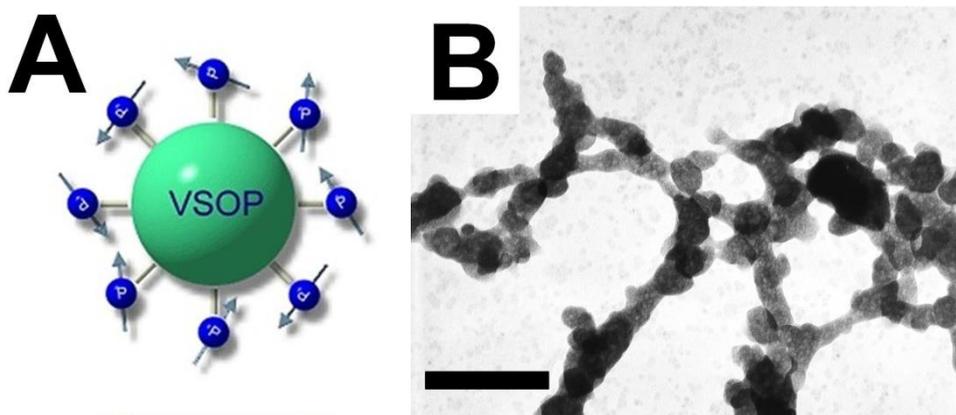


Abbildung 10: Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (VSOP) für die Markierung von Fettgewebstammzellen. A: schematische Darstellung eines Partikels bestehend aus einem eisenhaltigen Maghemit-Kern von 5 nm Durchmesser, umgeben von einer 1 bis 2 nm dicken Hülle aus monomeren Citrat (Quelle: Ferropharm GmbH, www.ferropharm.de). B: elektronenmikroskopische Aufnahme von Partikeln in wässriger Lösung (Balken = 20 nm).

Vor der Verwendung von VSOP als Zellmarker in *in vivo*-Versuchen sind einige *in vitro*-Versuche notwendig. Bei diesen gilt es zu untersuchen, ob und inwieweit die Markierung von Fettgewebstammzellen mit VSOP in den verwendeten Konzentrationen von 1,5 μM bis 1,5 mM die Proliferation, Migration, Koloniebildung, Vitalität und genomische Stabilität sowie das Multidifferenzierungspotential beeinflusst. Hierfür wurden humane ASC mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 μM , 0,015 mM, 0,15 mM und 1,5 mM markiert und die oben genannten Eigenschaften der Zellen im Vergleich zu unmarkierten Zellen *in vitro* untersucht (siehe Abbildung 11).

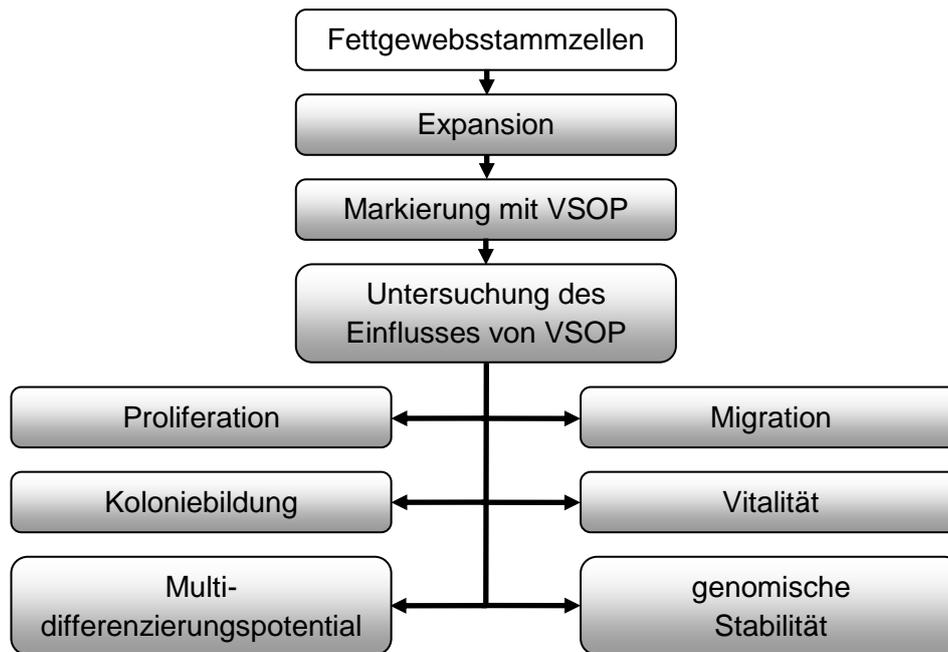


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Einflusses der Markierung mit VSOP auf Fettgewebstammzellen. Zum Vergleich wurden unmarkierte ASC verwendet.

2.5.1 Markierung von Fettgewebstammzellen

Konfluente humane und Kaninchen-ASC wurden in Zellkulturflaschen oder Lochplatten mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln markiert. Die kommerziell erhältliche wässrige Stammlösung, in der sich die Partikel befanden, hatte eine Konzentration von 0,5 mmol Eisen/ml (0,5 M). Für die Markierung wurden ASC der Passagen 2 bis 4 sowie Eisenkonzentrationen von 1,5 μM bis 1,5 mM verwendet. Die Markierung erfolgte durch die Zugabe einer Markierungslösung aus Expansionsmedium plus Nanopartikel. Zunächst wurde anhand der vorhandenen und zu markierenden Zellen die benötigte Menge an Expansionsmedium bestimmt. Mit den nun bestimmten Volumina an insgesamt benötigtem Medium wurden die Markierungslösungen entsprechend der gewünschten Eisenkonzentrationen hergestellt. Hierfür wurde folgende Berechnungsformel angewendet: $V = (B \times C \times 1000 / 0,5) \mu\text{l}$ wobei V dem benötigtem Volumen der Eisenoxidnanopartikel-Stocklösung in μl , B dem benötigtem Volumen an Expansionsmedium in ml und C der gewünschten Eisenkonzentration in mol/l entsprach. Von den Zellkulturen wurde das ursprüngliche Medium abgesaugt und die frisch hergestellten Markierungslösungen auf die Zellen gegeben und diese dann bei 37° C und 5% CO₂ für 90 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die ASC 3 x mit Zellwaschpuffer gewaschen und konnten dann für Versuche entsprechend Kapitel 2.1.2 abgelöst werden oder in den vorhandenen Flaschen oder Lochplatten weiter kultiviert werden.

2.5.2 Proliferation, Migration und Koloniebildung

2.5.2.1 Proliferationsassay

Die Proliferation markierter und unmarkierter Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) wurde durch die mehrmalige Bestimmung der Zellzahl mit dem CASY® Zellzählgerät über einen 10-tägigen Zeitraum untersucht. Hierfür wurden je Spender 6,25 Mio expandierte ASC auf insgesamt 25 mittlere Zellkulturflaschen verteilt. In jede Flasche wurden 250.000 Zellen plus 12 ml Expansionsmedium gegeben. Am Folgetag wurden die Zellen in 20 der Flaschen mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 μM ; 0,015 mM; 0,15 mM und 1,5 mM markiert. Pro VSOP-Konzentration waren je 5 Flaschen vorgesehen. Die Zellen in den verbleibenden 5 Flaschen wurden als unmarkierte Kontrolle verwendet. Unmittelbar nach der Markierung wurden die Zellen aus einer Flasche von jeder VSOP-Konzentration und der unmarkierten Kontrolle nach Kapitel 2.1.2 abgelöst. Mit dem CASY® Zellzählgerät wurde dann die Zellzahl bestimmt und die abgelösten Zellen nach der Zählung verworfen. Die erste Zellzahlbestimmung entsprach dem Tag 0. Die restlichen Zellen in den verbliebenen 20 Flaschen wurden bei 37° C und 5% CO₂ expandiert. An den Tagen 1, 3, 5, 8 und 10 wurde dieselbe Prozedur wie an Tag 0 durchgeführt.

2.5.2.2 Scratch-Assay

Der Scratch-Assay ist eine Methode, um die Migration von Zellen zu untersuchen. Diese beruht auf der Tatsache, dass beim Erzeugen einer künstlichen Wunde (scratch) auf einem konfluenten Zellrasen die Zellen am Wundrand in Richtung des Wundinneren migrieren. Dadurch wird die Wunde wieder verschlossen und neue interzelluläre Kontakte werden (wieder-)hergestellt. Die Fotodokumentation zu Beginn der Wundherzeugung und zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht die Bestimmung des Wanderungsgrads der Zellen (Liang et al., 2007).

Für den Scratch-Assay wurden je 1,5 Mio expandierte Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) auf 10 Wells in 6-Lochplatten verteilt. In jedes Well wurden 150.000 Zellen plus 2 ml Expansionsmedium gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 μM ; 0,015 mM; 0,15 mM und 1,5 mM markiert. Pro VSOP-Konzentration waren je 2 Wells vorgesehen. Die Zellen in den verbleibenden 2 Wells wurden als unmarkierte Kontrolle verwendet. Zur Wundherzeugung wurde nach der Markierung in jedem Well von Rand zu Rand durch den Mittelpunkt mit einer 200 μl -Pipettenspitze (Sarstedt AG & Co) durchgehend im Zellrasen am Boden entlanggestreift. Die Fotodokumentation im Bereich der Wunde erfolgte unmittelbar danach sowie nach 24 h am Fluoreszenzmikroskop mit Durchlicht (siehe Abbildung 12). Die Auswertung des Assays erfolgte mit einer Bildbearbeitungssoftware

(ImageJ, Version 1.47v, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Hierfür wurde bei jedem Bild des Zeitpunkts 0 die Breite der Wunde gemessen. Die ermittelten Wundbreiten entsprachen einem Wundverschluss von 0%. Dieselbe Prozedur wurde dann bei jedem Bild des Zeitpunkts 24 h wiederholt, die neuen Messwerte auf die des Zeitpunkts 0 bezogen und der Wundverschluss in % ermittelt.

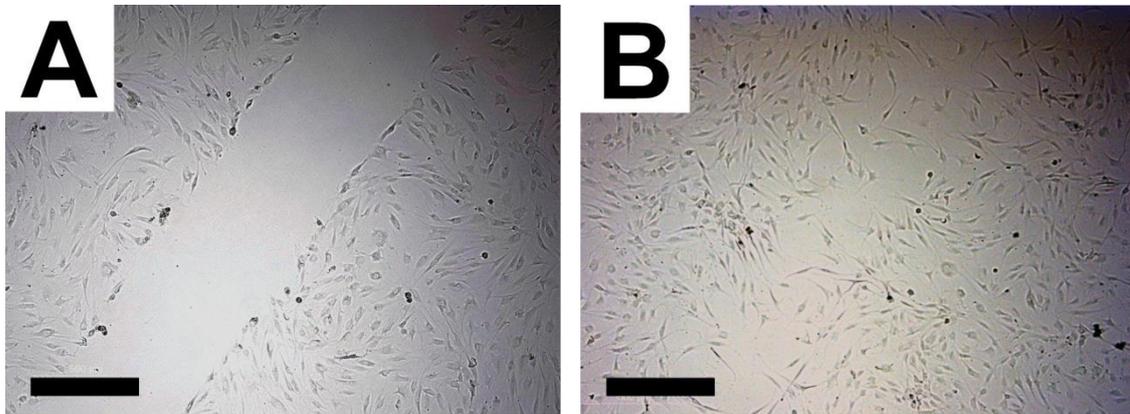


Abbildung 12: Scratch-Assay von Fettgewebstammzellen zur Untersuchung von Zellmigration und Wundverschluss. A: Zellrasen direkt nach Wundherzeugung. B: Zellrasen 24 h nach Wundherzeugung mit beginnendem Wundverschluss durch Migration der Zellen in das Wundinnere (Balken je 500 µm).

2.5.2.3 Koloniebildungsassay

Die Bildung von Kolonien ist eine typische Eigenschaft von mesenchymalen Stammzellen, wenn diese sehr dünn ausgesät werden (Friedenstein et al., 1974). Jede Kolonie wird von einer einzigen Zelle, einer Kolonie bildenden Einheit, gebildet (Pochampally, 2008). Mit dem Koloniebildungsassay kann die Koloniebildung von markierten und unmarkierten Fettgewebstammzellen untersucht werden.

ASC von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) wurden in 5 mittleren Zellkulturflaschen expandiert und bei einer Konfluenz von 80% mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 µM; 0,015 mM; 0,15 mM und 1,5 mM VSOP markiert. Je VSOP-Konzentration war eine Flasche vorgesehen. Die Zellen der verbleibenden Flasche wurden als unmarkierte Kontrolle verwendet. Nach der Markierung wurden die Zellen abgelöst, gezählt, zentrifugiert und à 1 Mio/ml in Expansionsmedium resuspendiert. Von jeder VSOP-Konzentration wurden je 1000 Zellen auf 3 Wells einer 6-Lochplatte plus 2 ml Expansionsmedium gegeben. Die Zellen wurden dann für 14 Tage ohne Mediumwechsel bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und auf jedes Well 1 ml einer 0,1%igen Kristallviolett-Lösung (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, D) für 15 min gegeben. Diese Lösung wurde dann abgesaugt und die Wells für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte die Auszählung der dunkelblau gefärbten Kolonien in den Wells.

2.5.3 Multidifferenzierungspotential

Expandierte Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) wurden mit VSOP in der Konzentration 1,5 mM markiert. Anschließend wurde das Multidifferenzierungspotential nach der bereits in Kapitel 2.2 beschriebenen Vorgehensweise untersucht.

2.5.4 Vitalität und genomische Stabilität

2.5.4.1 Trypanblau-Ausschlusstest

Mit dem Trypanblau-Ausschlusstest können vitale und tote Zellen farblich unterschieden und quantifiziert werden. Hierfür werden die Zellen einer Trypanblau-Färbelösung ausgesetzt. Vitale Zellen nehmen die Färbelösung nicht auf und werden somit nicht angefärbt. Tote Zellen hingegen nehmen bedingt durch Membrandefekte den Farbstoff auf und werden blau angefärbt (Phillips, 1973).

Je 750.000 expandierte Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) wurden auf 5 Wells einer 6-Lochplatte verteilt. In jedes Well wurden 150.000 Zellen plus 2 ml Expansionsmedium gegeben. Am Folgetag wurden die Zellen mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 μ M; 0,015 mM; 0,15 mM und 1,5 mM markiert. Je VSOP-Konzentration war ein Well vorgesehen. Die Zellen aus einem Well wurden zur Kontrolle nicht markiert. Nach dem Ablösen wurden die Zellen zentrifugiert und in 80 μ l Expansionsmedium resuspendiert. Von jeder Zellsuspension wurden 10 μ l mit 10 μ l einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich Corporation) in einem 500 μ l-Reaktionsgefäß (A. Hartenstein, Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik GmbH) vermischt. 10 μ l dieser Mischlösung wurden anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D) aufgetragen. Mit einem Durchlichtmikroskop (Axiolab, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) wurden jeweils gefärbte und nicht-gefärbte Zellen quantifiziert, wodurch der prozentuale Anteil an vitalen Zellen berechnet werden konnte.

2.5.4.2 MTT-Assay

Die Vitalität von Fettgewebstammzellen kann auch mit dem MTT-Assay bestimmt werden. Dieser Assay ist ein kolorimetrisches Verfahren mit dem die Stoffwechselaktivität NAD(P)H-abhängiger zellulärer Oxidoreduktase-Enzyme gemessen wird. Diese Enzyme reduzieren den Tetrazoliumfarbstoff (MTT) zu unlöslichem Formazan und es entsteht eine Violett-Färbung, wodurch die Anzahl vitaler Zellen wiedergespiegelt wird. Je stärker die Färbung, desto höher die Vitalität der Zellen. Der MTT-Assay kann somit zur Messung der Zytotoxizität oder zytostatischen Aktivität von Arzneistoffen und potentiell giftiger Substanzen verwendet werden.

Je 4 x 480.000 expandierte Fettgewebstammzellen von 6 Spendern (Spender Nr. 2, 3, 7, 9, 11 und 12) wurden auf je 48 Wells von 4 96-Lochplatten verteilt. In jedes Well wurden 10.000 Zellen plus 100 µl Expansionsmedium gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 µM; 0,015 mM; 0,15 mM und 1,5 mM markiert. Je VSOP-Konzentration waren 4 x 8 Wells vorgesehen. Von den verbliebenen 4 x 16 Wells mit unmarkierten Zellen dienten 4 x 8 Wells als Negativkontrolle und 4 x 8 Wells als Positivkontrolle. Nach der Markierung wurden die Zellen in 3 der 4 Lochplatten mit Expansionsmedium im Brutschrank inkubiert. Von der verbliebenen Lochplatte wurden 8 Wells mit unmarkierten Zellen mit 100 µl einer 3 mM tert-Butylhydroperoxid-Lösung (t-BHP, Luperox® TBH70X, Sigma-Aldrich Corporation) je Well, einer zytotoxischen Kontrollsubstanz, für 120 min im Brutschrank inkubiert. Diese Zellen dienten dann als Positivkontrolle. Die Markierung mit VSOP erfolgte für alle Zellen einmalig an Tag 0, während die Behandlung der entsprechenden Zellen mit t-BHP-Lösung an jedem Messtag erfolgte. Sofort nach der Markierung mit VSOP und der Behandlung mit t-BHP wurde von den Wells der Lochplatte das Medium abgesaugt. Dieses wurde dann durch 100 µl einer Mischlösung aus DMEM plus 1% Pen/Strep plus 0,5 mg/ml Thyazolyl-Blue Tetrazoliumbromid (MTT, Sigma-Aldrich Corporation) je Well ersetzt und für 4 h bei 37° C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurde dieses Gemisch vorsichtig aus den Wells abgesaugt und durch 100 µl 100%igen Isopropanol je Well ersetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der Lochplatte im Brutschrank zur Lösung des blauen Farbstoffs. Die Messung der Farbintensität wurde durch eine Absorptionsmessung am ELISA-Plattenlesegerät bei 570 nm durchgeführt. Diese Prozedur wurde an den Tagen 1, 2 und 3 in identischer Weise wiederholt. Die Absorption der unmarkierten Zellen der Negativkontrolle entsprach einer Vitalität von 100%. Die Absorptionen der markierten Zellen und die der Positivkontrolle wurden prozentual auf die Absorption der Negativkontrolle bezogen und somit die Vitalität bestimmt.

In einem Langzeitversuch wurden je 1 Mio expandierte ASC von 6 Spendern (Spender Nr. 1, 3, 5, 7, 8 und 13) auf 2 mittlere Zellkulturflaschen verteilt. In jede Flasche wurden 500.000 Zellen plus 12 ml Expansionsmedium gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen aus einer der beiden Flaschen mit VSOP in der Konzentration 1,5 mM markiert. Die Zellen in der anderen Flasche wurden zur Verwendung als Kontrollen nicht markiert. Einen Tag später wurden die Zellen aus den Flaschen abgelöst, gezählt, zentrifugiert, à 1 Mio/ml resuspendiert und auf 24 Wells einer 96-Lochplatte verteilt. In 8 der 14 Wells wurden markierte Zellen und in die verbliebenen 16 Wells unmarkierte Zellen gegeben. Je Well wurden 10.000 Zellen plus 100 µl Expansionsmedium ausgesät. Die restlichen markierten und unmarkierten Zellen wurden erneut in 2 mittlere Zellkulturflaschen plus 12 ml Expansionsmedium gegeben und im Brutschrank für 7 Tage expandiert (siehe Kapitel

2.1.2). Am Abend wurde von 8 der 16 Wells mit unmarkierten Zellen das Medium abgesaugt, durch 100 µl 0,1 mM t-BHP-Lösung je Well ersetzt und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Diese Zellen dienten als Positivkontrolle und die restlichen unmarkierten Zellen als Negativkontrolle. Am Tag darauf, dem Tag 0, erfolgte die Behandlung der Zellen mit MTT und die nachfolgende Auswertung wie bereits im selben Kapitel beschrieben. Diese Prozedur wurde in 7-tägigen Abständen an den Tagen 7, 14, 21 und 28 in identischer Weise wiederholt. Die Markierung mit VSOP erfolgte einmalig vor Tag 0, während die Behandlung mit t-BHP-Lösung an jedem Zeitpunkt über Nacht vor der Durchführung des Assays vollzogen wurde.

2.5.4.3 Annexin V-Test

Zu den ersten Erscheinungen absterbender Zellen gehören Membranschäden und Membranverluste. Dadurch werden Membran-Phospholipide wie Phosphatidylserin dem extrazellulären Medium ausgesetzt. Annexin V ist ein Phospholipid-Bindungsprotein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin. Treffen beide Stoffe aufeinander, kommt es zu einer Bindung. Wird Annexin V zusätzlich mit Fluorochromen wie APC konjugiert, kann diese Verbindung als sensitive Sonde in der Durchflusszytometrie für absterbende Zellen verwendet werden. Da die Bindung mit Annexin V bereits vor dem Zelltod stattfindet, kann durch die zusätzliche Verwendung eines Vitalfarbstoffs wie Propidiumiodid, zwischen frühen und späten Phasen des Zelltods unterschieden werden (Casciola-Rosen et al., 1996; van Engeland et al., 1996).

Je 1,2 Mio expandierte Fettgewebstammzellen von 6 Spendern (Spender Nr. 3, 5, 7, 8, 11 und 13) wurden auf 12 Wells von zwei 6-Lochplatten in 4-facher Ausführung verteilt. In jedes Well wurden 100.000 Zellen plus 2 ml Expansionsmedium gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Von jedem Lochplattenpaar wurden die Zellen in 8 der 12 Wells am nächsten Tag mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 µM; 0,015 mM; 0,15 mM und 1,5 mM markiert. Je 2 Wells waren für eine VSOP-Konzentration vorgesehen. 3 der 4 Lochplattenpaare wurden nach der Markierung im Brutschrank inkubiert. Die Zellen in 2 der 4 Wells mit unbehandelten Zellen des verbliebenen Lochplattenpaares wurden mit einer 3,5 mM t-BHP-Lösung, wie in diesem Kapitel beschrieben, behandelt. Als Negativkontrolle dienten die Zellen der übrigen 2 Wells. Nach der Markierung mit VSOP und der Behandlung mit t-BHP-Lösung wurden die Zellen des Lochplattenpaares aus den Wells abgelöst, in FACS-Röhrchen überführt und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände durch Invertieren der Röhrchen verworfen und Flüssigkeitsreste an den Rändern mit Zellstofftüchern (Clean and Clever, Igafa Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Ahrensfelde, D) entfernt. In jedes Röhrchen wurden dann 100 µl 1 x Annexin V-Bindepuffer (Becton Dickinson and Company) gegeben und

die Zellpellets durch kurzes Verwirbeln resuspendiert. Danach wurden 5 µl APC Annexin V-Lösung (Becton Dickinson and Company) plus 5 µl Propidiumiodid-Färbelösung (Becton Dickinson and Company) in jedes Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden anschließend für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden 400 µl 1 x Annexin V-Bindpuffer in jedes Röhrchen gegeben und diese durch kurzes Verwirbeln durchmischt. Die Messung wurde dann am Durchflusszytometer durchgeführt. FSC (11 V), SSC (390 V) und APC (385 V) wurden über die FACS-Software eingestellt und je Röhrchen 10.000 Zellen gezählt. Von den Gesamtzellpopulationen wurden die prozentualen Anteile nekrotischer Zellen und apoptotischer Zellen (siehe Abbildung 13) berechnet. Dieses Vorgehen wurde an den Tagen 1, 2 und 3 in identischer Weise wiederholt. Die Markierung mit VSOP erfolgte einmalig vor Tag 0 und die Behandlung mit t-BHP-Lösung an den jeweiligen Messtagen.

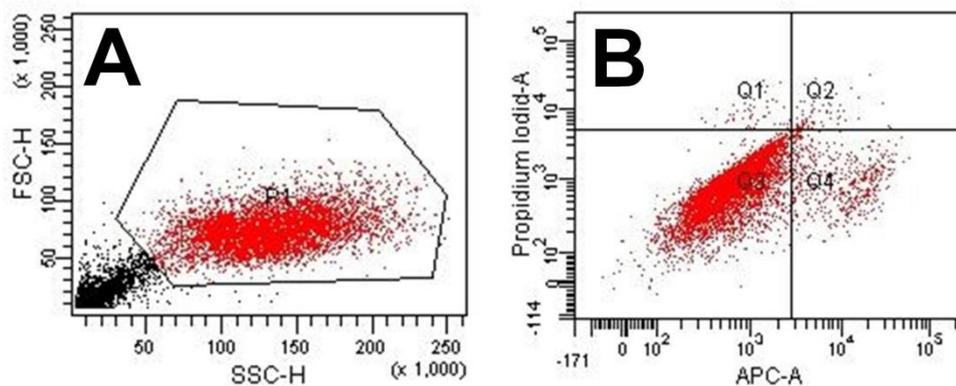


Abbildung 13: Datenausgabe der FACS-Software beim Annexin V-Test. A: Dotplot-Diagramm nach der Zellzählung. Die Gesamtzellpopulation wurde nachträglich eingekreist und ist rot dargestellt. B: eingekreiste Gesamtzellpopulation nach Aufteilung in 4 Quadranten. Q1 und Q2 (oben links und oben rechts) = nekrotische Zellen, Q3 (unten links) = vitale Zellen und Q4 (unten rechts) = apoptotische Zellen.

2.5.4.4 Chromosomenaberrationstest

Verschiedene Arten von Mutagenen induzieren strukturelle Chromosomenaberrationen über DNA-Brüche. Diese können sich wieder vereinigen und die Chromosomen werden in ihren ursprünglichen Zustand zurückversetzt. Ebenso können sie sich auch falsch oder überhaupt nicht mehr vereinigen. Diese Veränderungen auf chromosomaler Ebene führen nach der Zellteilung entweder zum Zelltod oder die Zelle überlebt geschädigt, was nachteilige Folgen für den Organismus haben könnte. Chromosomenaberrationen können mit einem Durchlichtmikroskop bei Zellen in der Metaphase ausgemacht und quantifiziert werden. Es wird zwischen strukturellen Aberrationen wie Lücken, Brüche, dizentrische Chromosomen und Ringchromosomen sowie numerischen Aberrationen wie Polyploidie, Hypodiploidie, Hyperdiploidie unterschieden. Je höher die Anzahl der Aberrationen, desto höher die genotoxische Wirkung einer Substanz, der die Zellen zuvor ausgesetzt waren.

Der Chromosomenaberrationstest wurde in Anlehnung an die Beschreibung von Sonoda et al. (1998) in leicht modifizierter Weise durchgeführt. Hierfür wurden je 960.000 expandierte Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) der Passage 1 auf 12 Wells von 3 rechteckigen 4-Well-Platten mit je einem sterilen Objektträger pro Well (Thermo Fisher Scientific Inc.) verteilt. In jedes Well wurden 80.000 Zellen plus 4 ml Expansionsmedium gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Abend des Folgetages wurden die Zellen in 8 der 12 Wells mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 μM ; 0,015 mM; 0,15 mM und 1,5 mM VSOP markiert. Je 2 Wells waren für eine VSOP-Konzentration vorgesehen. Von den unmarkierten Zellen in 2 der 4 verbliebenen Wells wurde das Medium durch 4 ml Expansionsmedium plus 100 μM Methylmethansulfonat-Lösung (MMS, Sigma-Aldrich Corporation) je Well ersetzt. Da es sich bei MMS um eine genotoxische, aber nicht zytotoxische Substanz handelt, dienen diese Zellen als Positivkontrolle. Die Zellen der anderen beiden Wells waren als Negativkontrolle vorgesehen. Zu allen Zellen wurden dann 10 μl Colcemid-Lösung (10 μg Demecolcin/ml PBS, Biochrom AG) gegeben und diese bis zum nächsten Morgen im Brutschrank inkubiert, wodurch bei den Zellen ein Zellzyklusstopp eintrat.

Am nächsten Morgen wurde eine 0,4%ige Kaliumchlorid-Lösung (Merck KGaA) im Wasserbad auf 37° C erwärmt und eine frisch angesetzte Fixierlösung im Gefrierfach auf -20° C vorgekühlt. Die Fixierlösung setzte sich aus einer Mischung aus einem Teil Methanol und 3 Teilen Eisessig (99-100%iger Eisessig, Mallinckrodt Baker B.V.) zusammen. Von den Wells wurden die Überstände abgesaugt und die Objektträger anschließend mit der 0,4%igen Kaliumchlorid-Lösung überschichtet. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37° C im Brutschrank wurde dann jedem Objektträger in den Wells 1 ml eiskalte Fixierlösung tropfenweise zugegeben und diese für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Überstände erneut abgesaugt, je Objektträger 5 ml eiskalte Fixierlösung zugegeben und für 20 min bei -20° C inkubiert. Nach Absaugen der Überstände und erneuter Zugabe von 5 ml Fixierlösung je Objektträger erfolgte eine weitere 10-minütige Inkubation bei -20° C. Die Überstände wurden erneut abgesaugt, die Objektträger aus den Wells genommen und dann bei Raumtemperatur angetrocknet. Danach wurden diese für 30 min auf eine 90° C heiße Heizplatte (M6, CAT/M. Zipperer GmbH, Staufen, D) gelegt und dann bei 60° C über Nacht im Backofen (Horo Dr. Hofmann GmbH, Ostfildern, D) getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für 45 sec in Trypsin-Lösung getaucht, mit destilliertem Wasser abgespült, für 2 min in Giemsa-Lösung (siehe Tabelle 16) getaucht und erneut 2 x kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Nachdem die Objektträger trocken waren, wurden diese mit Entellan® eingedeckt und an einem Durchlicht-Mikroskop (Leica Laborlux S, Leica Microsystems GmbH) ausgewertet.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Lösungen für den Chromosomenaberrationstest

Lösung	Komponenten	Menge
Trypsin-Lösung	2,5% Trypsin*	1 ml
	1 x PBS	100 ml
5%ige Giemsa-Lösung	Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung**	7 ml
	10 x Sörensen-Puffer	10 ml
	destilliertes Wasser	100 ml
10 x Sörensen-Puffer	Natriumdihydrogenphosphat**	11,13 g
	Kaliumdihydrogenphosphat**	8,5 g
	destilliertes Wasser	100 ml

* Biochrom AG; ** Merck KGaA.

Je Objektträgerpaar wurden 50 Mitosen ausgewertet (siehe Abbildung 14) und dabei Aberrationen wie Chromosomenbrüche, Chromatidbrüche und Reunionen nach dem Internationalen System für Humane Zytogenetische Nomenklatur (ISCN) quantifiziert (Harnden & Klinger, 1985). Dieses definiert einen Spalt als eine sich nicht eindeutig färbende Region eines Chromosoms. Ein Bruch hingegen wird als Diskontinuität eines Chromosoms definiert, welche eine eindeutig fehlerhafte Vereinigung eines Fragments von einem gebrochenen Chromosom aufweist.

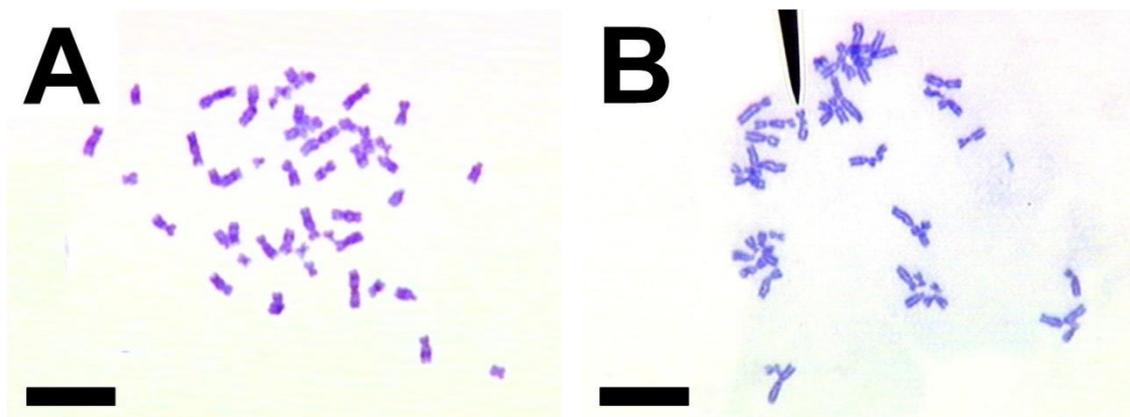


Abbildung 14: Chromosomensätze humaner Fettgewebstammzellen ($n = 23$ Chromosomenpaare) in der Mitose nach der Färbung mit Giemsa-Lösung (Balken je 10 μm). A: intakter Chromosomensatz. B: Chromosomensatz mit einer Aberration in Form eines Chromatidbruchs (siehe schwarze Spitze).

2.5.4.5 Comet-Assay

Mit dem Comet-Assay (Single Cell Gel Electrophoresis Assay oder Einzelzellgelelektrophorese) können DNA-Schäden auf zellulärer Ebene bei eukaryotischen Zellen festgestellt werden. Dieses Verfahren wurde erstmals im Jahr 1988 von Singh und Mitarbeitern beschrieben (Singh et al., 1988). Seitdem hat sich dieses als Screening-Methode von DNA-Schäden, -Reparatur und Genotoxizität entwickelt. Das Prinzip beruht auf der Einkapselung der Zellen in einem Agarosegel, der anschließenden

Lyse der Zellen und einer abschließenden Elektrophorese der lysierten, eingekapselten Zellkerne. Lyse und Elektrophorese der Zellkerne werden unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Nach der Elektrophorese resultieren aus den Zellkernen kometenähnliche Strukturen bestehend aus Kopf und Schweif. Nach der Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie z. B. Ethidiumbromid können diese mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Im Verhältnis zum Kopf steigen Intensität und Länge des Kometenschweifs in Relation zur Anzahl der DNA-Brüche (siehe Abbildung 15).

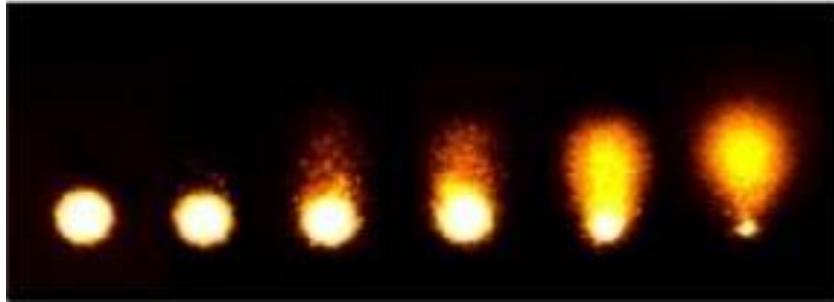


Abbildung 15: Comet-Assay unbehandelter und mit einem Schadstoff behandelter Zellen. Hier nimmt die DNA-Schädigung in den Zellkernen von links nach rechts zu. (Quelle: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen, Universitätsklinikum Würzburg).

Der Comet-Assay wurde nach der Beschreibung und den Empfehlungen von Tice et al. (2000) durchgeführt. Vor der Versuchsdurchführung wurden Objektträger mit gefrostenen Seitenrändern (76mm x 26 mm, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik) über Nacht in 100 ml-Glasküvetten (Glaswerk Wertheim, Wertheim, D) gestellt, welche mit einem Gemisch aus 40 ml Aceton und 40 ml Methanol (beide: Sigma-Aldrich Corporation) gefüllt waren. Am nächsten Tag wurden die Objektträger wieder entnommen und kurz abgewischt. Danach wurden 1,5 g MEEO-Agarose (Sigma-Aldrich Corporation) in 100 ml 1 x PBS in einem 250 ml-Becherglas (Schott AG) in der Mikrowelle aufgeköcht und die Objektträger bis zur Hälfte in die heiße Agarose-Lösung eingetaucht. Deren Unterseite wurde dann abgewischt und die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Zusätzlich wurden zur Lyse der Zellen je benötigter Glasküvette 75 ml Lyse-Lösung und je benötigter Elektrophoresekammer 2 l Elektrophoresepuffer nach Tabelle 17 angesetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Für den Comet-Assay wurden je 900.000 expandierte Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) der Passage 1 in 6 Wells einer 6-Lochplatte verteilt. In jedes Well wurden 150.000 Zellen plus 2 ml Expansionsmedium gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Lösungen für den Comet-Assay

Lösung	Komponenten	Menge
Lysepuffer (pH 10)	30% N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz*	20 g
	Natriumchlorid	292,8 g
	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	2,4 g
	Na ₂ -EDTA	74,4 g
	destilliertes Wasser	2 l
Lyse-Lösung	Lysepuffer (pH 10)	66,75 ml
	DMSO	7,5 ml
	Triton X-100	0,75 ml
Elektrophoresepuffer	5 M Natriumhydroxid**	120 ml
	0,2 M EDTA (pH 10)	10 ml
	destilliertes Wasser	1870 ml
Tris-Neutralisationspuffer (0,4 M, pH 7,5)	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	97 g
	destilliertes Wasser	2 l

* Serva Electrophoresis GmbH & Co. KG; ** Merck KGaA.

Am nächsten Tag wurden die Zellen in 4 der 6 Wells mit VSOP in den Konzentrationen 1,5 μ M; 0,015 mM, 0,15mM und 1,5 mM markiert. Für jede VSOP-Konzentration war ein Well vorgesehen. Unmarkierte Zellen aus einem Well dienten als Negativkontrolle, während die unmarkierten Zellen aus dem anderen Well für 90 min mit 200 μ M MMS als Positivkontrolle inkubiert wurden. Während der Markierung und Inkubation mit MMS wurden 50 mg Agarose Typ-VII in 10 ml 1 x PBS gelöst, in der Mikrowelle aufgekocht und auf eine 50° C warme Heizplatte gestellt. Die Zellen wurden dann aus den Lochplatten abgelöst, zentrifugiert und in je 80 μ l Expansionsmedium in einem 500 μ l-Reaktionsgefäß resuspendiert. Von den Zellsuspensionen wurden dann je 20 μ l mit 180 μ l warmer Agarose-Lösung vermischt. Im Anschluss wurden je 2 x 60 μ l der Zell-Agarose-Mischungen auf die Agarose-beschichteten Seiten von 2 Objektträgern gegeben und mit Deckgläsern (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik) zur Verfestigung der Agarose abgedeckt. Nach 3 bis 5 min wurden die Deckgläser wieder entfernt, die Objektträger in Glasküvetten plus Lyse-Lösung gegeben und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am Folgetag wurde eine Elektrophoresekammer (Renner GmbH, Dannstadt, D) in eine mit Eis gefüllte Wanne (Linpack Stucki Kunststoffverarbeitung GmbH, Bad Salzuflen, D) gelegt. Die Kammer wurde waagrecht ausgerichtet und mit kaltem Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Objektträger wurden dann in die Kammer gelegt und für 20 min vorinkubiert. Anschließend wurde für 20 min eine Spannung von 25 V und eine Stromstärke von 300 mA zur Elektrophorese angelegt. Die Objektträger wurden dann aus der Kammer genommen und für 5 min in eine Glasküvette plus 80 ml 0,4 M Tris-Neutralisationspuffer (siehe Tabelle 17) gegeben. Nach dieser Inkubation wurden die Objektträger nach dem Abtropfen von Pufferresten mit je 20 μ l Ethidiumbromid-Lösung (20 μ g/ml, Merck KGaA)

zur Anfärbung der DNA versehen und mit Deckgläsern abgedeckt. In einer dunklen und feuchten Kammer wurden die Objektträger dann bei 4° C aufbewahrt. Innerhalb einer Woche erfolgte die Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM4000B + Leica EL6000, Leica Microsystems GmbH) mittels einer Software (Komet 5.5, Kinetic Imaging Limited, Nottingham, UK). Je Objektträgerpaar wurden 100 Zellkerne ausgewertet. Zur Quantifizierung der DNA-Fragmentierung wurde mit einer weiteren Software (Analysis Macro 2000, Kinetic Imaging Limited) der Olive Tail Moment berechnet. Dieser ist als das Produkt der Schweiflänge und dem Anteil der Gesamt-DNA im Schweif definiert und spiegelt den Grad der DNA-Schädigung wieder (Olive et al., 1993).

2.5.5 Genexpression von Entzündungs-, Angiogenese- und Apoptosemarkern

Des Weiteren wurde der Einfluss der Markierung von Fettgewebstammzellen mit VSOP auf die Genexpression von Markern für Entzündungen, Angiogenese und Apoptose untersucht. In einem Langzeitversuch wurden je 1 Mio expandierte ASC von 6 Spendern (Spender Nr. 1, 3, 5, 7, 8 und 13) auf 2 mittlere Zellkulturflaschen verteilt. In jede Flasche wurden 500.000 Zellen plus 12 ml Expansionsmedium gegeben. Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die Zellen aus einer der beiden Flaschen mit VSOP in der Konzentration 1,5 mM markiert. Die Zellen in der anderen Flasche wurden zur Verwendung als Negativkontrolle nicht markiert. Nach der Markierung wurden markierte und unmarkierte Zellen aus den Flaschen abgelöst, gezählt, zentrifugiert und à 1 Mio/ml resuspendiert. Von jedem Spender wurden dann je 200.000 Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und erneut zentrifugiert. Entsprechend der Beschreibung aus Kapitel 2.2.4 wurde aus diesen Zellen zunächst die RNA isoliert und aus dieser cDNA generiert, welche für die RT-PCR verwendet wurde. Je 1 Mio der verblieben markierten und unmarkierten Zellen wurden erneut in mittleren Zellkulturflaschen ausgesät und mit Expansionsmedium weiter expandiert. Dieselbe Prozedur wurde dann an den Tagen 7, 14, 21 und 28 wiederholt. Die Markierung der Zellen mit VSOP erfolgte einmalig am Tag 0. Zur Untersuchung der Genexpression von Entzündungs-, Angiogenese- und Apoptosemarkern wurden folgende in Tabelle 18 aufgeführten spezifischen Primer plus TaqMan® Gensonden (alle: Life Technologies Corporation) verwendet. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung in Kapitel 2.2.4. Die Expression der spezifischen Markergene in VSOP-markierten Zellen sowie in unmarkierten Zellen wurde ebenfalls auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in denselben Zellen normiert. Danach wurde die normierte Genexpression der Markergene in VSOP-markierten Zellen auf die normierte Expression in unmarkierten Zellen bezogen.

Tabelle 18: Genspezifische Primer plus TaqMan® Gensonden für VSOP-markierte Zellen

Name des spezifischen Markergens	Kategorie	Gendatenbank-Nr.
Caspase 3 (CASP3)	AP	NM_004346.3
Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)	H	NM_001256799.1
Interleukin 6 (IL-6)	E	NM_000600.3
Interleukin 8 (IL-8)	E	NM_000584.3
Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)	AN	NM_001025366.2

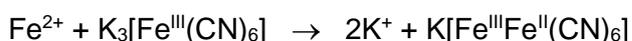
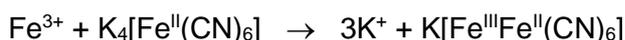
Apoptose (AP), Entzündung (E), Angiogenese (AN), Haushaltsgen (H)

2.6 Detektion von Fettgewebstammzellen nach der Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln

Neben der Analyse des Einflusses der Markierung mit VSOP auf die Biologie und Physiologie von Fettgewebstammzellen ist es ebenso von großer Bedeutung, die Nachweisbarkeit von markierten ASC *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Schließlich soll die Verwendung von VSOP als Zellmarker hauptsächlich dem Nachweis und der Nachverfolgung markierter Zellen nach deren Implantation dienen. Ob die Nanopartikel bei Applikationen in der Laryngologie dafür geeignet sind, wurde mittels gängiger Nachweismethoden wie der Berlinerblau-Färbung, Transmissionselektronenmikroskopie und Magnetresonanztomographie analysiert.

2.6.1 Berlinerblau-Färbung

Zur Verifizierung der intrazellulären Aufnahme der Eisenoxidnanopartikel wird hauptsächlich die Berlinerblau-Reaktion angewendet (Ittrich et al., 2005). Diese ist in der analytischen Chemie eine weit verbreitete Methode zum Nachweis von Eisen. Unlösliches Berlinerblau ($\text{Fe}_7[\text{CN}]_{18}$) ist ein tiefblaues synthetisches Pigment. Wird eine wässrige Lösung aus Kaliumhexacyanoferrat II ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) mit einem in Wasser gelösten Eisen(III)-Salz oder einer wässrige Lösung aus Kaliumhexacyanoferrat III ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) mit einem in Wasser gelösten Eisen(II)-Salz versetzt, entsteht zunächst lösliches Berlinerblau ($\text{K}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$). Bei gleichen Molverhältnissen geschieht dies nach folgenden zwei chemischen Reaktionen:



Unlösliches Berlinerblau entsteht erst durch einen Überschuss von Eisen(III)- bzw. Eisen(II)-Ionen in der Form eines blauen Niederschlags.

Expandierte Fettgewebstammzellen von 8 Spendern (Spender Nr. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 und 13) wurden in 6-Lochplatten ausgesät. Von jedem Spender wurden 2 x 150.000 Zellen plus 2 ml Expansionsmedium in 2 Wells gegeben und diese über Nacht im Brutschrank kultiviert. Je Spender wurden am nächsten Tag die Zellen in einem der 2 Wells mit VSOP in der Konzentration 1,5 mM markiert, während die Zellen im anderen Well als unmarkierte Kontrolle dienten. Die Färbung der Zellen erfolgte unmittelbar nach der Markierung. In einem Langzeitversuch wurden ASC von 6 Spendern (Spender Nr. 1, 3, 5, 7, 8, 10 und 13) in mittleren Zellkulturflaschen ausgesät. Je Spender wurden 2 x 500.000 Zellen plus 12 ml Expansionsmedium in 2 Flaschen gegeben. Von jedem Spender wurden die Zellen in jeweils einer der beiden Flaschen mit VSOP in der Konzentration 1,5 mM markiert. Die Zellen der anderen Flasche dienten als Negativkontrolle. Am Folgetag wurden die Zellen abgelöst und von jedem Spender jeweils 150.000 markierte und unmarkierte Zellen in 2 Wells einer 6-Lochplatte gegeben. Die übrigen Zellen wurden erneut in mittleren Zellkulturflaschen ausgesät und im Brutschrank weiter kultiviert. In 7-tägigen Abständen wurde dieselbe Prozedur 4 x wiederholt. Die Färbung der Zellen erfolgte jeweils am Tag nach der Aussaat in den Wells. Zusätzlich wurden Gewebeschnitte der hochdichten Zellkugeln aus markierten ASC der chondrogenen Differenzierung (siehe Kapitel 2.5.3) gefärbt.

Vor der Färbung wurden die Zellen in den 6-Lochplatten für 15 min mit 2 ml 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und dann mit destilliertem Wasser kurz gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 6 ml Berlinerblau-Reagenz für 30 min bei Raumtemperatur gegeben. Objektträger mit Gewebeschnitten wurden analog in Glasküvetten gefärbt. Das Berlinerblau-Reagenz setzte sich aus einer 2%igen Salzsäurelösung (Salzsäure rauchend 37%ig, Merck KGaA) und einer 1%igen Kaliumhexacyanoferrat III-Lösung (Merck KGaA) zusammen, welche in gleichen Teilen miteinander vermischt wurden. Wells und Objektträger wurden dann 3 x mit destilliertem Wasser für je 5 min gewaschen und anschließend für 5 min mit 2 ml Kernechtrot-Lösung (siehe Kapitel 2.2.2) versehen bzw. in diese eingetaucht. Nach einem erneuten kurzen Waschschrift mit destilliertem Wasser erfolgte die Dehydrierung der Zellen und Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Kapitel 2.2.2). Nach Trocknung der Zellen und Gewebeschnitte wurden diese mit dem Fluoreszenzmikroskop bei Durchlicht betrachtet und die Aufnahme der Nanopartikel durch Blaufärbung verifiziert. Zusätzlich erfolgte eine Fotodokumentation.

2.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) können intrazelluläre Eisenoxidnanopartikel nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem ein Elektronenstrahl durch extrem dünne Probenschnitte geleitet wird. Beim Durchgang des Strahls interagieren die Elektronen mit der Probe. Aus dieser Elektroneninteraktion wird dann ein Bild generiert, welches anschließend vergrößert und auf eine Abbildungsvorrichtung wie einen fluoreszierenden Bildschirm, einen fotografischen Film oder einen Sensor fokussiert wird.

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden je 200.000 expandierte Fettgewebstammzellen von 5 Spendern (Spender Nr. 2, 4, 8, 10 und 13) in je einem Well einer 6-Lochplatte mit 2 ml Expansionsmedium ausgesät und am nächsten Tag mit VSOP in der Konzentration 1,5 mM markiert. Nach Ablösen der Zellen wurden diese in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Jedes Zellpellet wurde dann mit 500 µl einer Lösung aus 2,5%igem Glutaraldehyd (Merck KGaA) gelöst in 50 mM Cacodylatpuffer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) überschichtet und über Nacht zur Fixierung der Zellen im Kühlschrank inkubiert. Am Folgetag wurde diese Lösung vorsichtig abgesaugt, jedes Pellet mit 500 µl 50 mM Cacodylatpuffer überschichtet und die Pellets im Kühlschrank für mehrere Tage gelagert. Die fixierten und konservierten Pellets wurden dann von der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. Georg Krohne, Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie (Zoologie I) am Biozentrum der Universität Würzburg, in Kunstharz eingebettet und geschnitten. Als Kontrastmittel wurde Osmiumtetroxid (Carl Roth GmbH) verwendet. An einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM10, Carl Zeiss AG) erfolgten die Visualisierung einzelner Zellen und die Fotodokumentation.

2.6.3 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein medizinisches Bildgebungsverfahren mit dem innere Strukturen des Körpers detailliert dargestellt werden können. Es bietet ebenfalls die Möglichkeit, VSOP-markierte Zellen nachzuweisen, da die Nanopartikel mit dem Magnetfeld des MRT interagieren. Hierfür wird die Kernspinresonanz von Atomen der zu untersuchenden Strukturen genutzt, welche sich innerhalb eines großen und starken Magneten des MRT-Scanners befinden. Dessen Magnetfeld und Radiofrequenzfelder werden zur Ausrichtung und Ausrichtungsänderung der Magnetisierung der sich im Magneten befindenden Atomkerne verwendet (Shiel, 2012). Dadurch wird in diesen Kernen ein rotierendes, durch den Scanner nachweisbares Magnetfeld erzeugt. Gradienten im Magnetfeld führen zu unterschiedlichen ortsabhängigen Rotationsgeschwindigkeiten der Atomkerne. Mit dieser Information wird ein Bild mit unterschiedlichen Kontrasten des gescannten Bereichs generiert.

2.6.3.1 Markierte Fettgewebstammzellen in Agarosegelen

Zunächst wurden Fettgewebstammzellen von 4 Spendern (Spender Nr. 3, 4, 8 und 13) in 7 großen Zellkulturflaschen je Spender expandiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90% wurden je Spender die Zellen in 6 der 7 Flaschen mit VSOP in den Konzentrationen 0,15 mM, 0,3 mM, 0,45 mM, 0,6 mM, 1,05 mM und 1,5 mM markiert. Für jede VSOP-Konzentration war eine Flasche vorgesehen. Die Zellen in der verbliebenen Flasche dienten als unmarkierte Kontrolle. Unmittelbar nach der Markierung wurden die Zellen abgelöst, gezählt und zentrifugiert. Von jeder VSOP-Konzentration sowie von unmarkierten Zellen wurden 3 x 900.000 Zellen in je 900 µl 37°C warmer 1,5 %iger Agarose Typ VII-Lösung resuspendiert. Diese Agarose-Lösungen mit Zellen wurden sofort luftblasenfrei in Wells einer 24-Lochplatte zur Verfestigung der Agarose gegeben. Die Zelldichte in den Gelen betrug 1 Mio/ml und die Gele hatten einen Durchmesser von 1,5 cm und eine Höhe von 0,5 cm. Nach der Verfestigung der Gele und anschließender Fixierung in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung wurde deren Messung im Hochfeld-MRT-Gerät (11,7 Tesla, Bruker Avance 500 WB, Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Daniel Haddad am MRB Forschungszentrum für Magnet-Resonanz-Bayern e. V. der Universität Würzburg durchgeführt. Maximal 4 Gele konnten zusammen gemessen werden.

2.6.3.2 Markierte Fettgewebstammzellen in Kaninchenstimmlippen

Hierfür wurden zunächst Fettgewebstammzellen von 9 Spendertieren (Tiere Nr. 3, 4, 5, 6, 26, 37, 39, 44 und 2016) expandiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen mit VSOP in der Konzentration 1,5 mM markiert. Nach der Markierung wurden diese abgelöst, gezählt und à 3,3 Mio/ml in Expansionsmedium resuspendiert. Anschließend wurde wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben bei 9 Spendertieren (Tiere Nr. 3, 4, 5, 6, 26, 37, 39, 44 und 2016) die Narkose eingeleitet. Alle operativen Eingriffe an den Versuchstieren wurden von Frau PD Dr. med. Katrin Frölich mit Assistenz von Frau Petra Joa durchgeführt. Nach Erreichen der Narkosetiefe wurden bei den Versuchstieren mit einem Kaninchenlaryngoskop (siehe Abbildung 16 A) und einem Endoskop mit entsprechender Optik (Telepack X, Karl Storz GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) die Stimmlippen dargestellt (siehe Abbildung 16 B). Anschließend wurden mit einer langen Injektionsnadel jeweils 300 µl der Suspension aus markierten körpereigenen Zellen endolaryngeal in die rechte Stimmlippe injiziert (siehe Abbildung 16 C). Ziel war dabei, eine Augmentation zu erreichen. Nach den Eingriffen erfolgte eine endoskopische Kontrolle, um Beeinträchtigungen der Atemwege wie Schwellung, Hämatome und Blutungen auszuschließen. Die Tiere wurden dann zum Aufwachen in eine Kaninchenbox gebracht und in den darauffolgenden Tagen weiter beobachtet.



Abbildung 16: Injektion von körpereigenen, VSOP-markierten Fettgewebstammzellen in Kaninchenstimmlippen. A: Seitenansicht des Kaninchenlaryngoskops, welches zur Betrachtung und Injektion am Kehlkopf diente (Quelle: PD Dr. med. Katrin Frölich, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen, Universitätsklinikum Würzburg). B: Darstellung der Stimmlippen mit dem Endoskop. C: endolaryngeale Injektion der Suspension aus körpereigenen, VSOP-markierten ASC in die rechte Stimmlippe mit einer langen Injektionsnadel.

6 und 12 Wochen nach den Stimmlippen-Injektionen wurde bei den Tieren erneut die Narkose eingeleitet und diese durch eine intravenöse Gabe von 2 ml T61 (5 mg Tetracainhydrochlorid/ml, 50 mg Mebazoniumiodid/ml, 200 mg Embutramid/ml, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D) euthanasiert. Anschließend wurden die Kehlköpfe explantiert, in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Daniel Haddad am MRB Forschungszentrum für Magnet-Resonanz-Bayern e. V. der Universität Würzburg im Hochfeld-MRT-Gerät gemessen. Nach Abschluss der Messungen wurden die fixierten Kehlköpfe entsprechend für die Histologie verarbeitet (siehe Kapitel 2.2.2). Ein zusätzlicher Nachweis der VSOP-markierten Fettgewebstammzellen in den Stimmlippen wurde mit der Berlinerblau-Färbung (siehe Kapitel 2.6.1) von Gewebeschnitten der Kehlköpfe durchgeführt.

2.7 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Alle Grafiken und statistischen Analysen wurden mit dem Programm IBM® SPSS® Statistics, Version 20 (International Business Machines Corporation, IBM, Armonk, NY, USA) erstellt bzw. durchgeführt.

Ergebnisse wurden im Fall von Vergleichen unterschiedlicher Zeitpunkte in Liniendiagrammen dargestellt. Für Vergleiche ohne zeitlichen Verlauf wurden Boxplots gewählt. Die Boxen der Boxplots zeigen den Medianwert sowie das obere und untere Quartil. Die Whisker stellen Werte dar, die außerhalb der Box liegen und haben eine maximale Länge des 1,5-fachen Interquartilabstands. Werte, die sich zwischen dem 1,5- und 3-fachen Interquartilabstand befinden, sind als Ausreißer (○) dargestellt. Darüber hinausragende Werte sind Extremwerte (*).

Für statistische Berechnungen wurden alle Werte berücksichtigt und zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Da dies bei $n = 4$ nicht möglich war, erfolgte in diesen Fällen nur eine Deskription ohne die Anwendung eines statistischen Testverfahrens zur Ermittlung von Signifikanzen (Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Bei $n = 6$ und $n = 8$ wurde der exakte Friedman-Test als nicht-parametrisches Signifikanz-Testverfahren für die statistische Analyse angewendet. Nach der Identifizierung von Signifikanzen mit dem exakten Friedman-Test wurde anschließend der Wilcoxon-Test angewendet. Dieser ermöglichte es durch den Vergleich von Stichprobenpaaren zuvor identifizierte Signifikanzen einzelnen Werten zuzuordnen. Lag zur statistischen Untersuchung nur ein Stichprobenpaar vor, wurde nur der Wilcoxon-Test angewendet. Als Signifikanz wurde für beide Tests $p < 0,05$ angenommen. Mit der nachfolgenden Bonferroni-Korrektur wurde der angenommene p-Wert von 0,05 durch die Anzahl der untersuchten Paare dividiert. Die daraus resultierenden neuen p-Werte wurden dann als neue Signifikanzschwellen angenommen. Signifikante Unterschiede sind in den graphischen Darstellungen figuriert (+).

3 ERGEBNISSE

3.1 Phänotypische Eigenschaften von Fettgewebstammzellen

Isolierte Fettgewebstammzellen aus humanem Fettgewebe, humanem Liposuktionsmaterial (siehe Abbildung 17 A) und Kaninchennackenfett wiesen nach der Aussaat eine Adhärenz am Boden der Zellkulturflaschen auf und zeigten eine spindelförmige, fibroblastenähnliche Morphologie (siehe Abbildung 17 B).

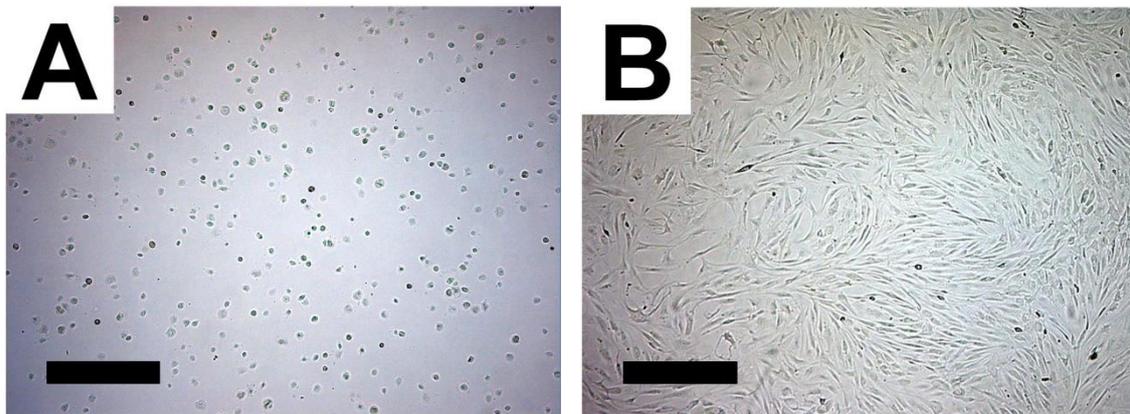


Abbildung 17: Humane Fettgewebstammzellen in einer Zellkulturflasche an unterschiedlichen Zeitpunkten. A: unmittelbar nach Aussaat. B: 4 Tage nach Aussaat in der Expansionsphase (Balken je 500 µm).

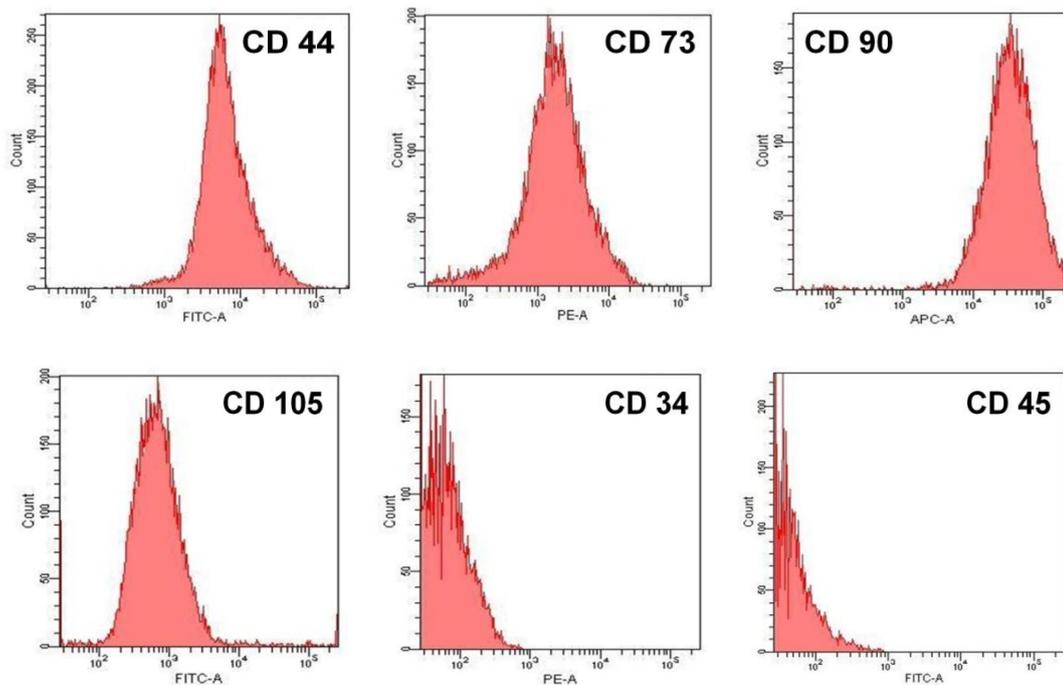


Abbildung 18: Bestimmung der Anwesenheit stammzelltypischer Oberflächenmarkerproteine bei humanen Fettgewebstammzellen mittels Durchflusszytometrie. Die x-Achse zeigt die Intensität des Fluoreszenzsignals und die y-Achse die Zellzahl. CD44, CD73, CD90 und CD105 waren positiv und CD 34 und CD 45 waren negativ.

Die Anwesenheit von stammzelltypischen Oberflächenmarkerproteinen konnte mittels Durchflusszytometrie bei isolierten, humanen ASC der Passage 2 nachgewiesen werden. Diese Zellen wiesen die Oberflächenmarkerproteine CD44, CD73, CD90 und CD105 auf, während CD34 und CD45 nicht anwesend waren. Dies ist in den Histogrammen in Abbildung 18 beispielhaft für einen Spender dargestellt.

3.2 Multidifferenzierungspotential von Fettgewebstammzellen zu phänotypähnlichen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen

3.2.1 Histologischer Nachweis der Differenzierung

In humanen Fettgewebstammzellen konnten nach 14-tägiger adipogener Differenzierung nach der Oil Red-O-Färbung intrazelluläre Lipidvakuolen durch eine intensive Rotfärbung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19 A). Analog hierzu zeigten sich bei diesen Zellen nach 21-tägiger osteogener Differenzierung schwarzgrau sowie intensiv orangerot gefärbte extrazelluläre Calcium-Ablagerungen nach der von Kossa-Färbung (siehe Abbildung 19 B) bzw. Alizarin Red-S-Färbung (siehe Abbildung 19 C).

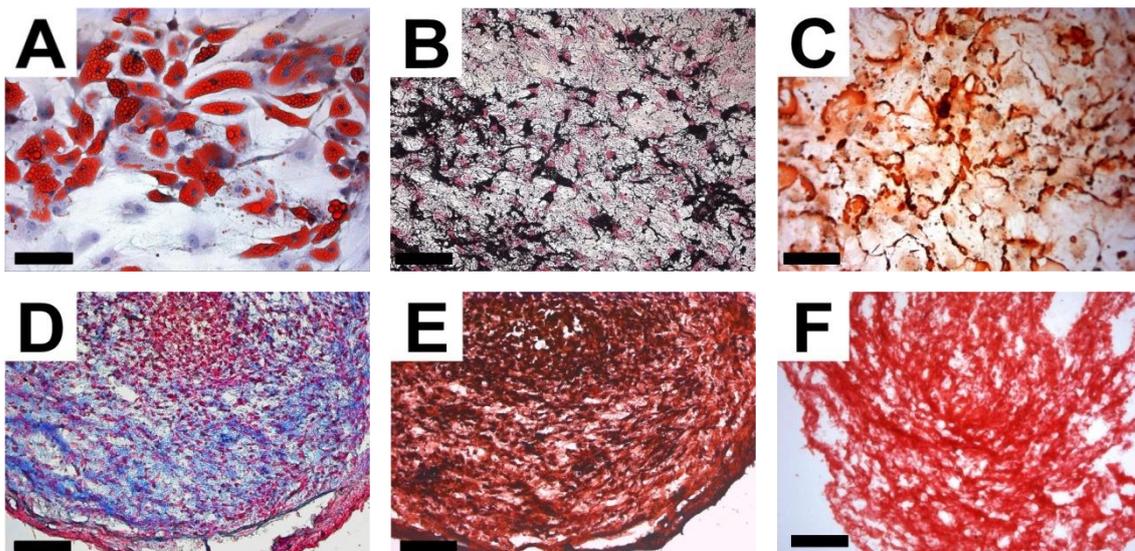


Abbildung 19: Histologischer Nachweis der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierung von humanen ASC. A: Oil Red-O-Färbung zum Nachweis von intrazellulären Lipidvakuolen nach 14-tägiger adipogener Differenzierung. B: von Kossa-Färbung zum Nachweis von extrazellulären Calcium-Ablagerungen nach 21-tägiger osteogener Differenzierung. C: Alizarin Red-S-Färbung zum Nachweis von extrazellulären Calcium-Ablagerungen nach 21-tägiger osteogener Differenzierung. D: Alcianblau-Färbung zum Nachweis der Anreicherung saurer Proteoglykane nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung. E: Safranin-O-Färbung zum Nachweis der Anreicherung sulfatierter Proteoglykane nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung. F: Pikrosiriusrot-Färbung zum Nachweis der Kollagenanreicherung nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung (Balken je 100 μm).

Hochdichte Zellkugeln aus ASC wiesen nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung nach der Alcianblau-Färbung Blaufärbungen des Gewebes auf (siehe Abbildung 19 D) und gaben Hinweise auf die Anwesenheit von sauren Proteoglykanen. Analog hierzu war dies durch braunrote Färbungen dieses Gewebes nach der Safranin-O-Färbung für sulfatierte Proteoglykane zu beobachten (siehe Abbildung 19 E). Die Pikrosiriusrot-Färbung gab durch eine intensive Rotfärbung das Vorhandensein von Kollagen in den hochdichten Zellkugeln zu erkennen (siehe Abbildung 19 F).

3.2.2 Biochemischer Nachweis der Differenzierung

Bei hochdichten Zellkugeln aus humanen Fettgewebstammzellen konnte nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung die Anreicherung von Kollagen und Glykosaminoglykanen biochemisch nachgewiesen und quantifiziert werden. Hierbei zeigten sich ein durchschnittlicher Kollagengehalt von etwa 0,15 µg/µg DNA und ein Glykosaminoglykangehalt von etwa 0,015 µg/µg DNA.

3.2.3 Expression gewebespezifischer Markergene

Die Expression der gewebespezifischen Markergene für Fett, Knochen und Knorpel in differenzierten und undifferenzierten humanen Fettgewebstammzellen sowie in nativen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen wurde auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Anschließend wurde die normierte Expression der Markergene in differenzierten Zellen sowie die in nativen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen auf die normierte Markergenexpression in undifferenzierten Zellen nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode bezogen (siehe Kapitel 2.2.4). Der Vergleich dieser relativen Genexpression zwischen differenzierten ASC und Zellen der entsprechenden Nativgewebe ist in Abbildung 20 dargestellt. Hier stellt der Wert 0 die relative Genexpression in undifferenzierten Zellen dar. ASC wiesen nach adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Zellen eine höhere relative Expression spezifischer Markergene für Fett (FABP4, LEP, LPL), Knochen (ALPL, BGLAP, RUNX2) und Knorpel (COL2A1, CRTAC, SOX9) auf. Die relative Expression des Markergens Aggrekan (ACAN) lag in differenzierten Zellen unterhalb undifferenzierter Zellen. Der Unterschied der relativen Expression zwischen Zellen der entsprechenden Nativgewebe und differenzierten Zellen war bei allen Markergenen außer RUNX2 signifikant (Wilcoxon-Test).

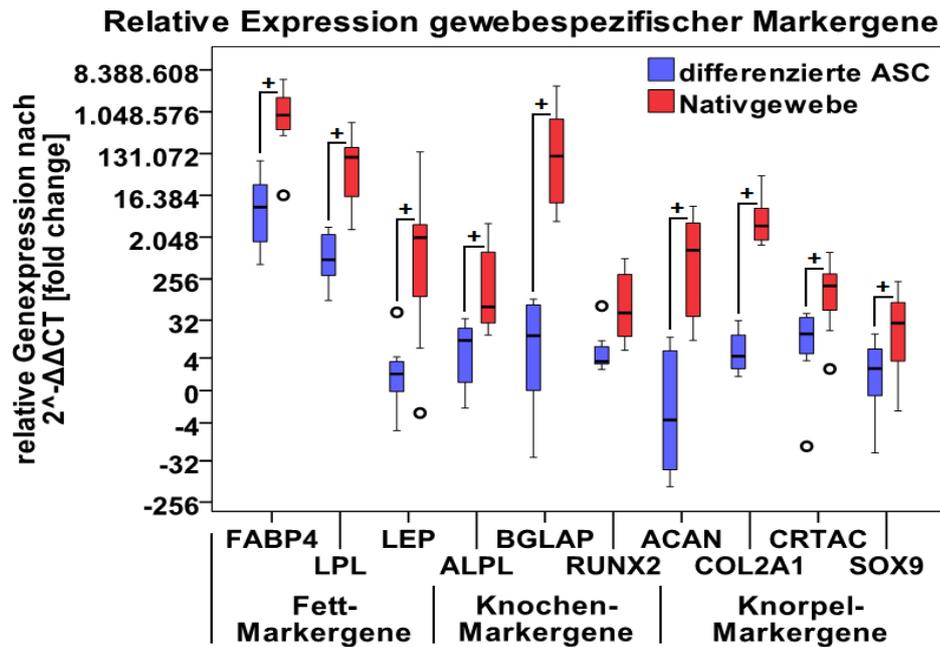


Abbildung 20: Relative Expression gewebespezifischer Markergene in humanen ASC nach adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierung im Vergleich zu nativen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen. Die Genexpression beider Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgen GAPDH normiert und auf undifferenzierte Zellen bezogen. Die relative Expression der spezifischen Markergene für Fett, Knochen und Knorpel lag in differenzierten Zellen bis auf das knorpelspezifische Markergen ACAN oberhalb der Genexpression undifferenzierter Zellen. Bei allen Markergenen außer RUNX2 war der Unterschied in der relativen Expression zwischen Zellen aus Nativgewebe und differenzierten Zellen im Wilcoxon-Test signifikant (n = 8).

3.3 Chondrogene Differenzierung von Fettgewebstammzellen in Hydrogelen

Nach der Besiedelung mit humanen Fettgewebstammzellen und der darauffolgenden 14-tägigen chondrogenen Differenzierung erwiesen sich alle Hydrogelkombinationen außer Hydrogele aus Kollagen und Hyaluronsäure als form- und volumenstabil. Agarosefreie Gele waren elastischer, während agarosehaltige Gele brüchig waren. Hydrogele aus Kollagen-Hyaluronsäure zeigten bereits einige Tage nach der Induktion der chondrogenen Differenzierung eine starke Schrumpfung (siehe Abbildung 21). Diese Beobachtungen waren von den für die chondrogenen Differenzierung verwendeten Differenzierungsmedien unabhängig.

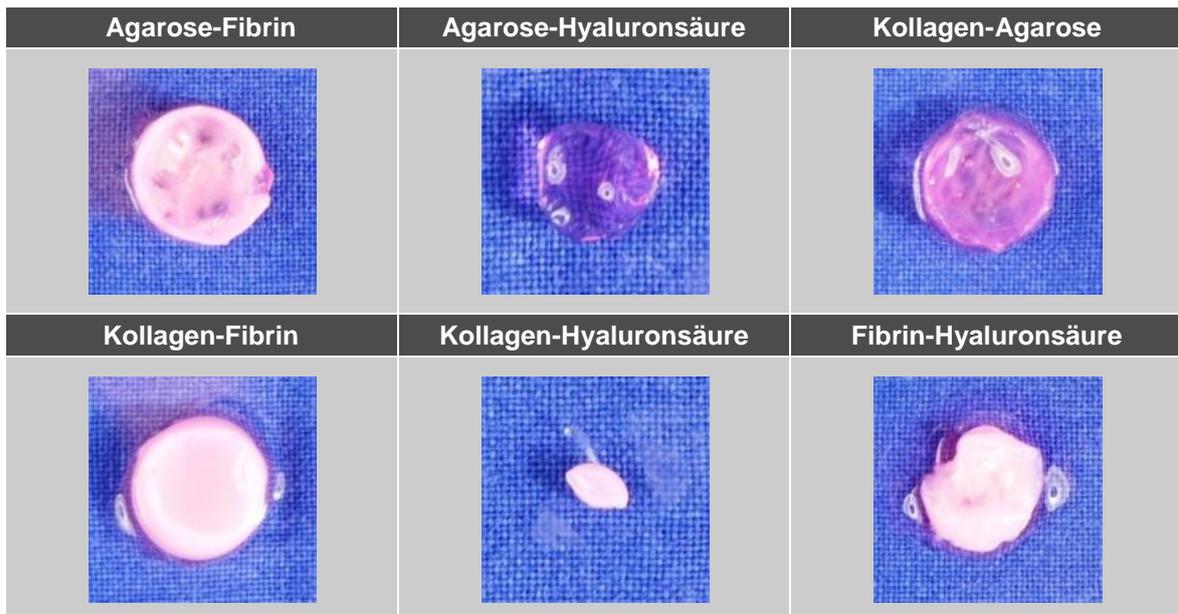


Abbildung 21: Mit humanen Fettgewebstammzellen besiedelte Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung mit der Wachstumsfaktorkombination TGF- β 3 plus BMP-6. Eine starke Schrumpfung war bei den Gelen aus Kollagen-Hyaluronsäure zu beobachten, während sich die anderen Hydrogelkombinationen als form- und volumenstabil erwiesen (ursprünglicher Geldurchmesser = 15 mm).

3.3.1 Anreicherung von extrazellulären Knorpelmatrixproteinen

3.3.1.1 Alcianblau-Färbung

Die Alcianblau-Färbung zeigte in den zellbesiedelten Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung durch unterschiedlich intensive Blaufärbungen eine unterschiedliche Anreicherung von sauren Proteoglykanen. Die Blaufärbung war in den agarosehaltigen Gelen eher homogen und mit der von Nativknorpel vergleichbar, während die Zellverteilung in diesen Gelen sehr inhomogen war. Eine Verstärkung der Blaufärbung durch die Verwendung der Wachstumsfaktorkombinationen TGF- β 3 plus BMP-6 und TGF- β 3 plus IGF-I im Vergleich zu TGF- β 3 alleine war in diesen Gelen nicht nachweisbar. Im Kontrast hierzu war die Blaufärbung in den agarosefreien Gelen inhomogen und in den oberen Randbereichen am stärksten während die Zellverteilung eher homogen war. Eine mit Nativknorpel vergleichbare Blaufärbung war nur in den geschrumpften Gelen aus Kollagen-Hyaluronsäure zu beobachten. Die Verwendung der Wachstumsfaktorkombinationen verstärkte die Blaufärbung in diesen sowie bei Gelen aus Fibrin-Hyaluronsäure nur minimal. Eine knorpelähnliche Morphologie war nur in den agarosefreien Hydrogelen zu sehen. Abbildung 22 zeigt dies beispielhaft für einen Spender im Vergleich zu Nativknorpel.

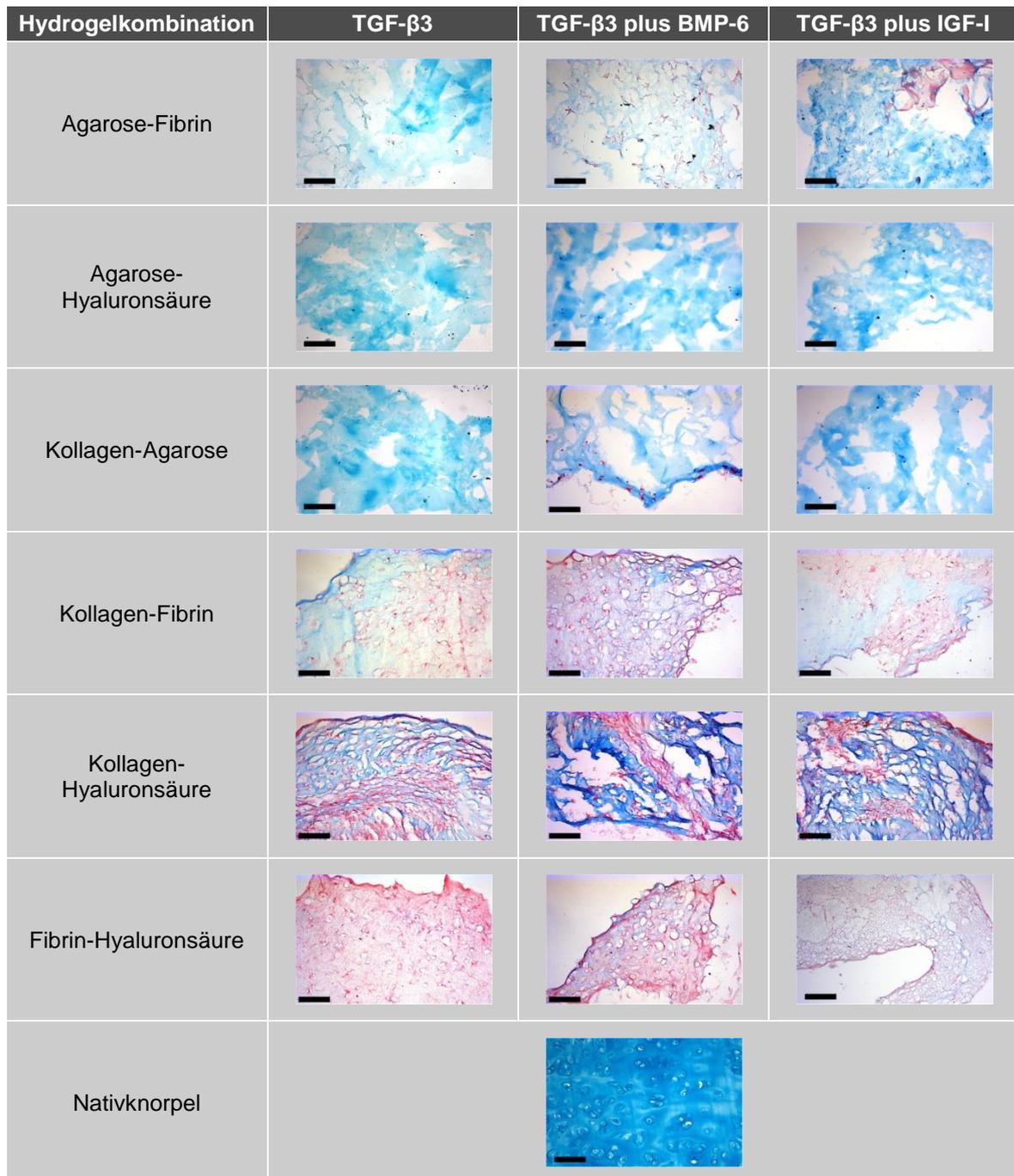


Abbildung 22: Alcianblau-Färbung zum Nachweis von sauren Proteoglykanen in ASC-besiedelten Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu Nativknorpel (Balken je 100 μ m). Die Blaufärbung in den Hydrogelen zeigte die stärkste Anreicherung von sauren Proteoglykanen in Gelen aus Kollagen-Hyaluronsäure. Eine minimale Verstärkung der Proteoglykananreicherung durch die Verwendung der Wachstumsfaktorkombinationen TGF- β 3 plus BMP-6 und TGF- β 3 plus IGF-I war bei den agarosefreien Gelen gegeben, ebenso wie eine knorpelähnliche Morphologie und eine homogene Zellverteilung.

3.3.1.2 Safranin-O-Färbung

Nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung zeigte die Safranin-O-Färbung in denselben zellbesiedelten Hydrogelkombinationen durch unterschiedlich intensive Rotfärbungen eine unterschiedliche Anreicherung von sulfatierten Proteoglykanen. Abbildung 23 zeigt dies beispielhaft für einen Spender im Vergleich zu Nativknorpel.

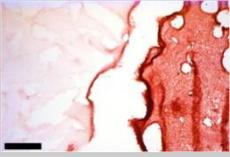
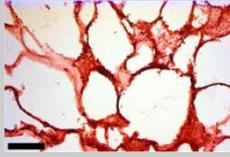
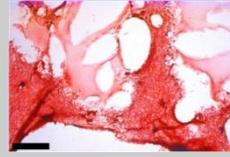
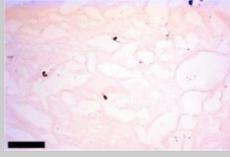
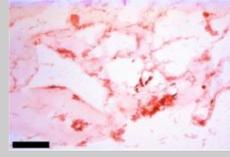
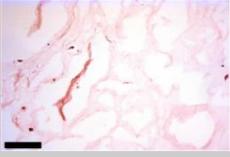
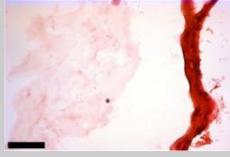
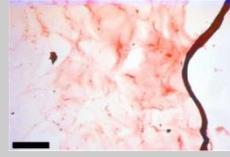
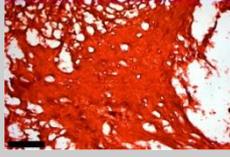
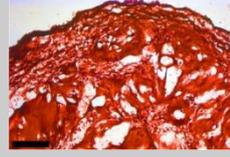
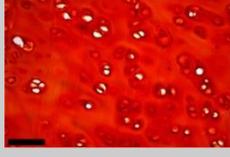
Hydrogelkombination	TGF- β 3	TGF- β 3 plus BMP-6	TGF- β 3 plus IGF-I
Agarose-Fibrin			
Agarose-Hyaluronsäure			
Kollagen-Agarose			
Kollagen-Fibrin			
Kollagen-Hyaluronsäure			
Fibrin-Hyaluronsäure			
Nativknorpel			

Abbildung 23: Safranin-O-Färbung zum Nachweis von sulfatierten Proteoglykanen in ASC-besiedelten Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu Nativknorpel (Balken je 100 μ m). Die Rotfärbung in den Gelen zeigte die stärkste Anreicherung von sulfatierten Proteoglykanen in den agarosefreien Gelen. Die Wachstumsfaktorkombinationen verstärkten die Rotfärbung der Gele nicht.

Agarosehaltige Gele zeigten in Gelen aus Agarose-Fibrin eine inhomogene Rotfärbung, welche nur stellenweise mit der von Nativknorpel vergleichbar war. In den restlichen agarosehaltigen Gelen war diese nur sehr vereinzelt nachweisbar. Im Gegensatz hierzu war die Rotfärbung in allen agarosefreien Gelen sehr homogen und mehr oder weniger mit der von Nativknorpel vergleichbar. Eine Verstärkung der Rotfärbung durch die Verwendung der Wachstumsfaktorkombinationen blieb in allen Gelen aus.

3.3.1.3 Pikrosiriusrot-Färbung

Die Pikrosiriusrot-Färbung zeigte in den zellbesiedelten und ursprünglich nicht kollagenhaltigen Hydrogelkombinationen unterschiedlich intensive Rotfärbungen, welche auf eine unterschiedliche Kollagenanreicherung hindeuteten. Abbildung 24 zeigt dies beispielhaft für einen Spender im Vergleich zu Nativknorpel. Die ursprünglich kollagenhaltigen Hydrogelkombinationen Kollagen-Agarose, Kollagen-Fibrin und Kollagen-Hyaluronsäure wurden nicht dieser Färbung unterzogen und sind daher in der nachfolgenden Abbildung nicht aufgeführt.

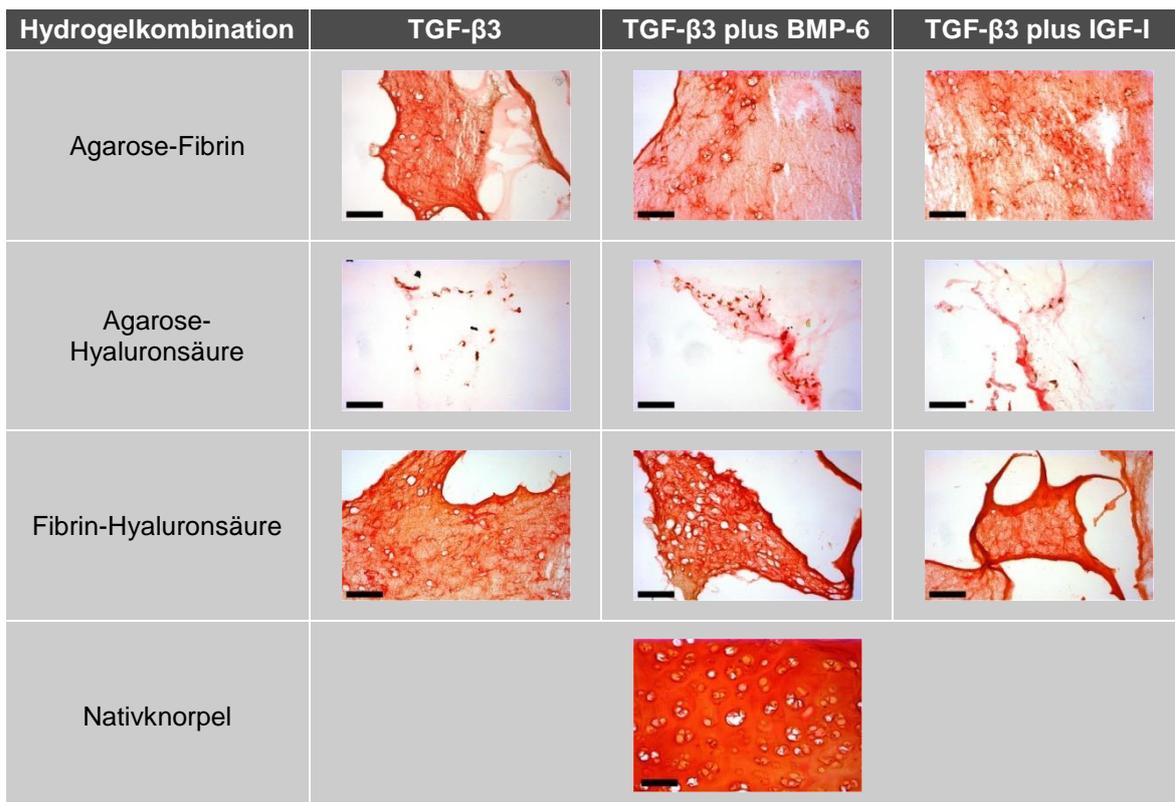


Abbildung 24: Pikrosiriusrot-Färbung zum Nachweis von Kollagen in ASC-besiedelten Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu Nativknorpel (Balken je 100 μ m). Die Rotfärbung in den Gelen zeigte die stärkste Kollagenanreicherung in fibrinhaltigen Gelkombinationen. Die Verwendung der Wachstumsfaktorkombinationen zeigte nur in Gelen aus Agarose-Hyaluronsäure und Fibrin-Hyaluronsäure eine leichte Verstärkung der Rotfärbung.

Die Rotfärbung war in den fibrinhaltigen Gelen stärker und homogener als in den fibrinfreien Gelen. Mit der von Nativknorpel vergleichbar war diese in Gelen aus Fibrin-Hyaluronsäure sowie stellenweise in Gelen aus Agarose-Fibrin. In fibrinfreien Gelen war die Rotfärbung am schwächsten und nur sehr vereinzelt mit Nativknorpel vergleichbar. Eine minimale Verstärkung der Rotfärbung durch die Verwendung der Wachstumsfaktorkombinationen war nur in den Fibrin-Hyaluronsäure-Gelen und in denen aus Agarose und Hyaluronsäure zu erkennen.

3.3.1.4 Chromogene Färbungen

Nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung waren nach den chromogenen Färbungen mit Anti-Aggrekan, Anti-Kollagen Typ II und Anti-SOX9 unterschiedlich intensive Braunfärbungen in den zellbesiedelten Hydrogelkombinationen zu beobachten. Diese gaben Hinweise auf die Anreicherung von Aggrekan und Kollagen Typ II sowie die Expression von SOX9. Abbildung 25 stellt dies beispielhaft für einen Spender und für die Wachstumsfaktorkombination TGF- β 3 plus IGF-I dar. Die Aggrekananreicherung war in den Gelen aus Kollagen-Hyaluronsäure durch eine sehr schwache Braunfärbung nur minimal auszumachen, während diese in den restlichen Gelen ausblieb. Die Kollagen Typ II-Anreicherung war in den fibrinhaltigen Gelen am deutlichsten ausgeprägt und die Braunfärbung stellenweise mit der von Nativknorpel vergleichbar. In fibrinfreien Gelen war die Kollagen Typ II- Anreicherung hingegen nur sehr schwach oder blieb ganz aus. Eine knorpelähnliche Expression von SOX9 wurde durch eine mit Nativknorpel vergleichbare Braunfärbung in den Zellkernen (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 25) nachgewiesen.

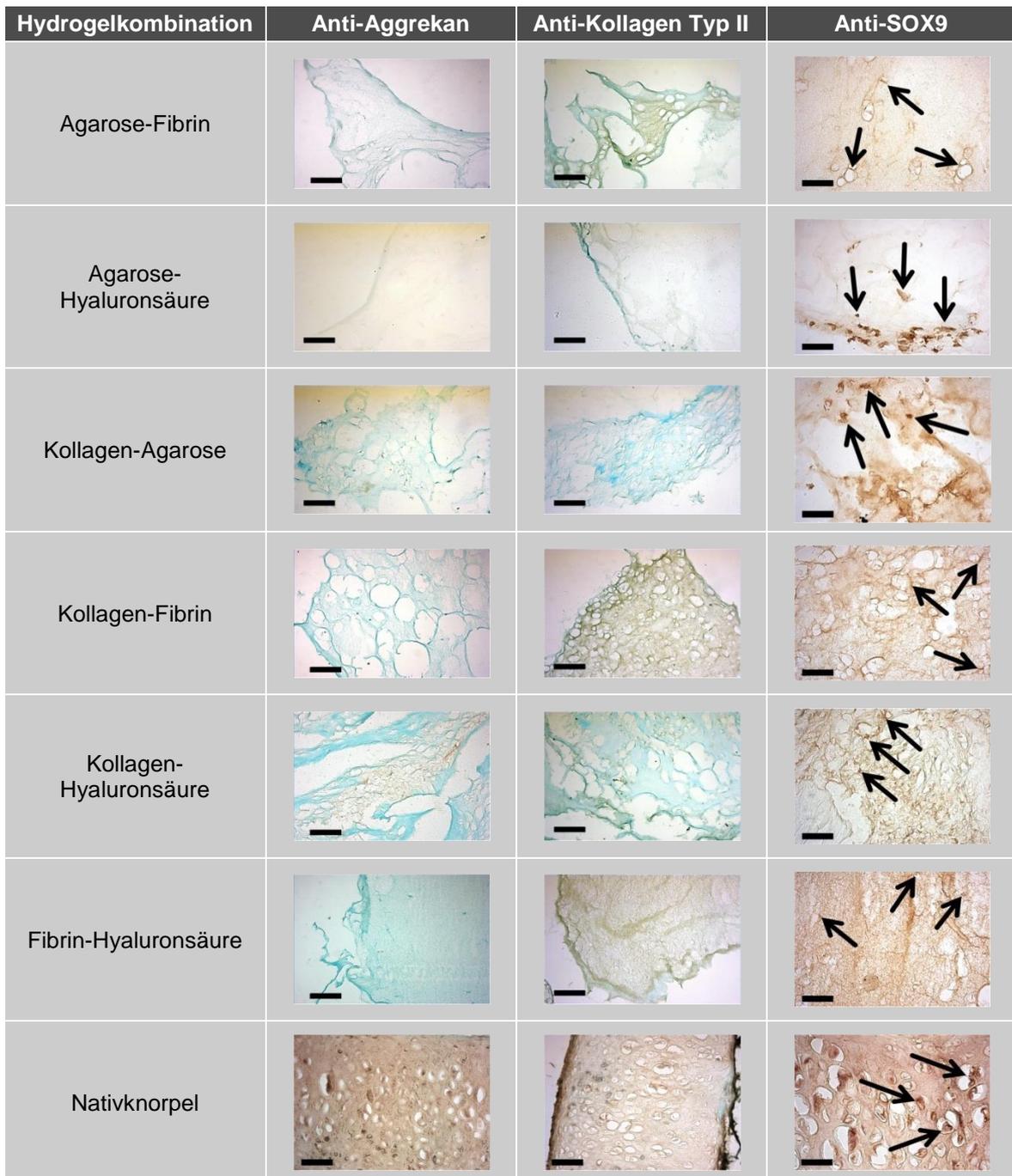


Abbildung 25: Chromogene Färbungen mit Anti-Aggrekan, Anti-Kollagen Typ II und Anti-SOX9 zum Nachweis von Aggrekan, Kollagen Typ II (beide: Balken je 100 μm) und der Expression von SOX9 (Balken je 50 μm) in ASC-besiedelten Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu Nativknorpel. Eine sehr schwache Ablagerung von Aggrekan zeigte sich nur in Gelen aus Kollagen-Hyaluronsäure. Fibrinhaltige Gele wiesen die höchste Kollagen Typ II-Anreicherung auf. Es zeigte sich eine knorpelähnliche Expression von SOX9 in den Zellkernen der Zell-Hydrogelkonstrukte (siehe schwarze Pfeile).

3.3.2 Quantitativer Nachweis von Knorpelmatrixproteinen

3.3.2.1 DNA-Gehalt

Nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung bewegte sich der DNA-Gehalt in den zellbesiedelten Hydrogelkombinationen zwischen 150 und 350 μg DNA je Gel (siehe Abbildung 26). Zwischen den unterschiedlichen Hydrogelkombinationen (jeweils alle blauen, roten und grünen Boxen) und innerhalb einer Hydrogelkombination (Gruppen aus jeweils einer blauen, grünen und roten Box) waren keine ausgeprägten Abweichungen des DNA-Gehalts zu beobachten.

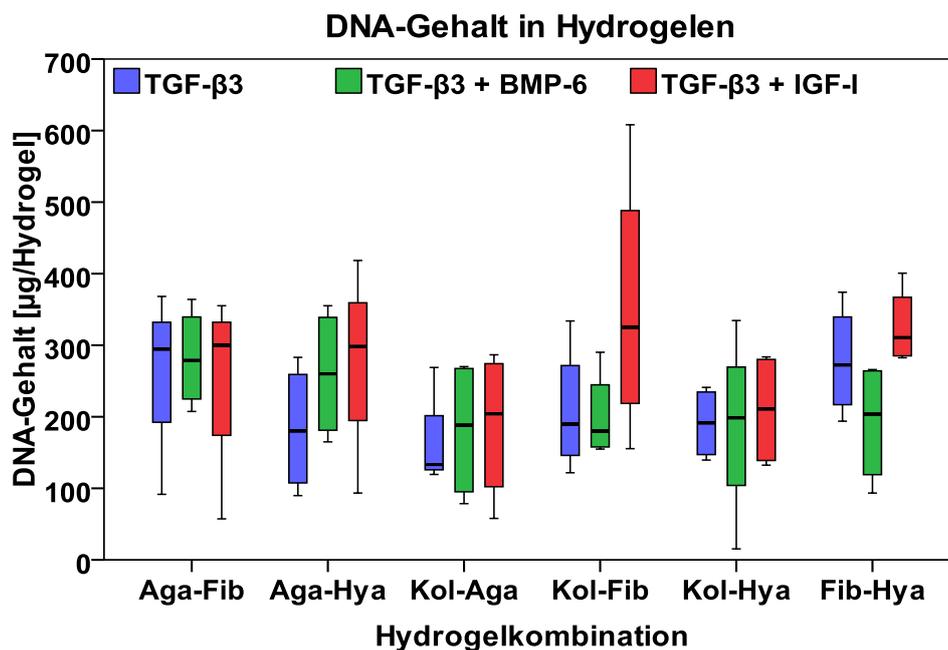


Abbildung 26: DNA-Gehalt in ASC-besiedelten Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung. Dieser bewegte sich zwischen 150 und 350 μg DNA je Gel ($n = 4$).

3.3.2.2 Kollagengehalt

Der Kollagengehalt bewegte sich nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung in den Hydrogelen zwischen 0,05 und 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ DNA (siehe Abbildung 27). Zwischen den Hydrogelkombinationen und innerhalb einer Hydrogelkombination waren keine ausgeprägten Abweichungen des Kollagengehalts nachweisbar.

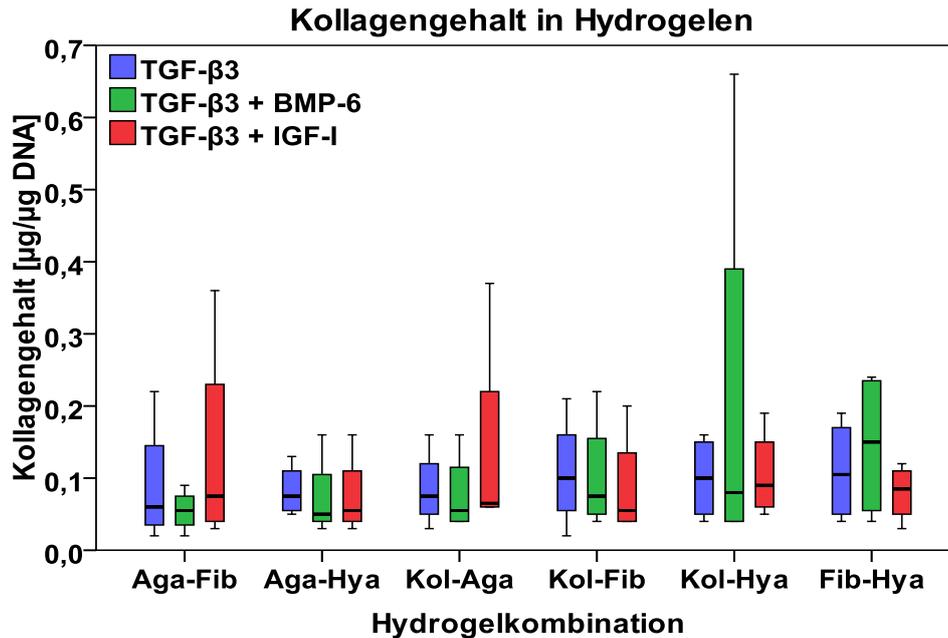


Abbildung 27: Kollagengehalt in ASC-besiedelten Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung. Dieser bewegte sich zwischen 0,05 und 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ DNA ($n=4$).

3.3.2.3 Glykosaminoglykangehalt

In den Hydrogelkombinationen lag der Glykosaminoglykangehalt nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung zwischen 0,02 und 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ DNA (siehe Abbildung 28).

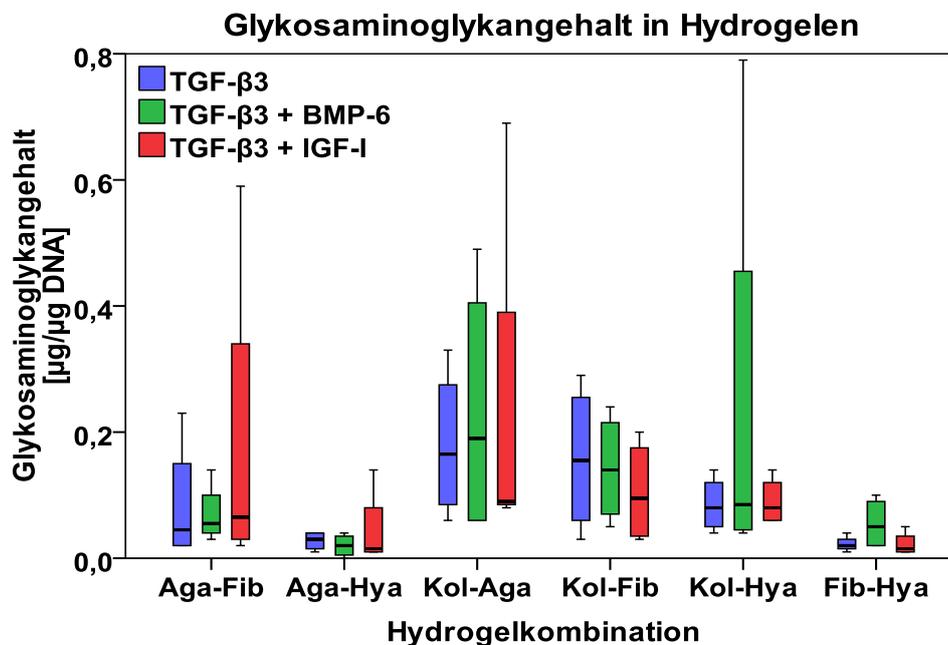


Abbildung 28: Glykosaminoglykangehalt in ASC-besiedelten Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung. Dieser bewegte sich zwischen 0,02 und 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ DNA ($n=4$).

Die Gelkombinationen Kollagen-Agarose (Kol-Aga) und Kollagen-Fibrin (Kol-Fib) kamen dem Wert von 0,2 μg Glykosaminoglykan/ μg DNA am nächsten.

3.3.3 Expression knorpelspezifischer Markergene

In den folgenden Abschnitten ist die relative Expression der untersuchten knorpelspezifischen Markergene für jedes Gen jeweils einzeln beschrieben und graphisch dargestellt. Die Expression der Markergene in Fettgewebstammzellen, die in Hydrogelkombinationen über 14 Tage chondrogen differenziert wurden, in undifferenzierten Zellen und in nativen Knorpelzellen (siehe schwarz-gestrichelte horizontale Linien) wurde auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Anschließend wurde die normierte Genexpression differenzierter Zellen und nativer Knorpelzellen auf die normierte Genexpression undifferenzierter Zellen bezogen. Der Wert 0 stellt die relative Genexpression in undifferenzierten Zellen dar. Wie bereits in Kapitel 2.7 erwähnt, beschränkt sich die Analyse dieses Datenteils auf die Deskription.

3.3.3.1 Aggrekan

Die relative Expression des Markergens Aggrekan (ACAN) ist in Abbildung 29 dargestellt.

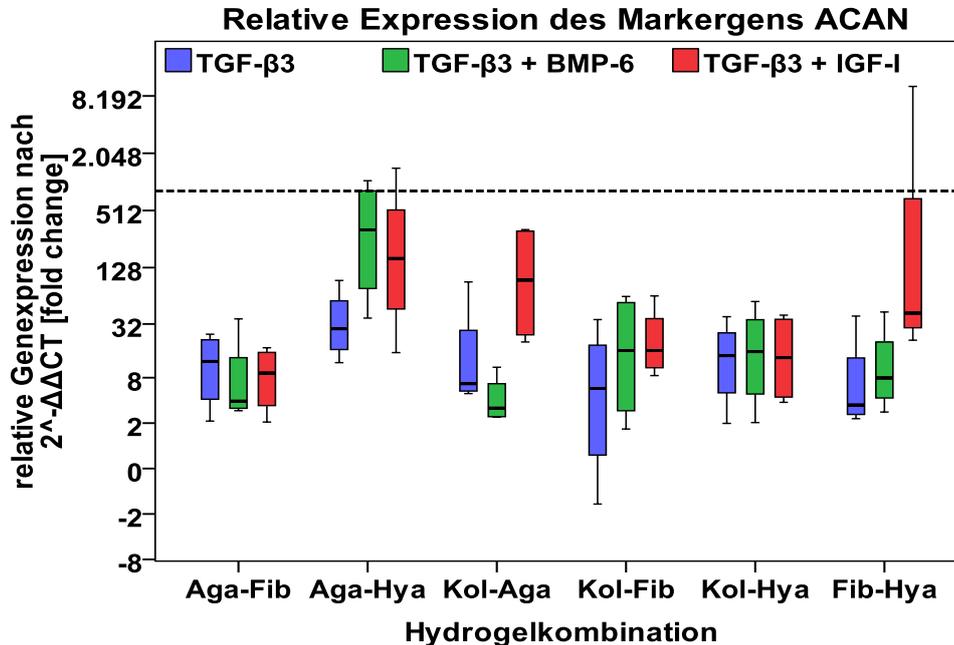


Abbildung 29: Relative Expression des Markergens Aggrekan (ACAN) in Fettgewebstammzellen aus Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu nativen Knorpelzellen. Die Genexpression beider Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgens GAPDH normiert und auf undifferenzierte Zellen bezogen. In differenzierten Zellen bewegte sich die relative Genexpression von Aggrekan unterhalb der von nativen Knorpelzellen (schwarz gestrichelte Linie). Die relative Genexpression der Fettgewebstammzellen in Gelen aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) kam der von Nativknorpelzellen am nächsten ($n = 4$).

In differenzierten Zellen aller Hydrogelkombinationen lag diese unterhalb der relativen Genexpression nativer Knorpelzellen. Zellen der Gele aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya), die mit TGF- β 3 plus BMP-6 differenziert wurden, kamen dem Wert der Genexpression von Nativknorpel am nächsten. In letzteren Gelen und in denen aus Kollagen-Fibrin (Kol-Fib) lag die Genexpression nach der Differenzierung mit beiden Wachstumsfaktorkombinationen näher an nativen Knorpelzellen als nur mit TGF- β 3 alleine. Dies zeigte sich in Kollagen-Agarose-Gelen (Kol-Aga) und Fibrin-Hyaluronsäure-Gelen (Fib-Hya) nur mit TGF- β 3 plus IGF-I.

3.3.3.2 Cartilage oligomeric matrix protein

Abbildung 30 zeigt die relative Expression des Markergens „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP). Diese lag in differenzierten Zellen aller Hydrogelkombinationen oberhalb der relativen Genexpression dieses Markergens in nativen Knorpelzellen. Am deutlichsten ausgeprägt war dies in Zellen der Gele aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) nach der Differenzierung mit TGF- β 3 plus BMP-6.

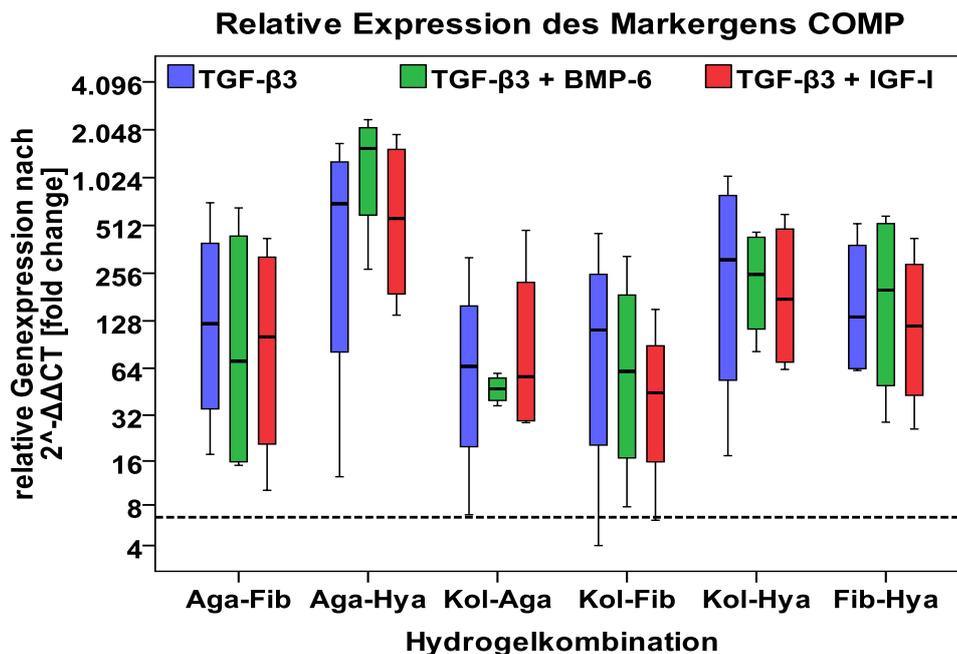


Abbildung 30: Relative Expression des Markergens „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP) in Fettgewebstammzellen aus Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu nativen Knorpelzellen. Die Genexpression beider Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgen GAPDH normiert und auf undifferenzierte Zellen bezogen. Differenzierte Zellen in Hydrogelkombinationen wiesen eine relative Genexpression auf, die oberhalb der von nativen Knorpelzellen (schwarz gestrichelte Linie) lag. In differenzierten Zellen der Agarose-Hyaluronsäure-Gelkombinationen (Aga-Hya) war dies am stärksten ausgeprägt (n = 4).

3.3.3.3 Cartilage acidic protein 1

In Abbildung 31 ist die relative Expression des Markergens „cartilage acidic protein 1“ (CRTAC) dargestellt, welche in differenzierten Zellen der Hydrogelkombination Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) nach der Differenzierung mit TGF- β 3 plus BMP-6 oberhalb der Expression dieses Markergens in nativen Knorpelzellen lag. In differenzierten Fettgewebstammzellen der restlichen Hydrogelkombinationen bewegte sich die Genexpression von CRTAC unterhalb der von Nativknorpelzellen. Zellen der Gele aus Kollagen-Fibrin (Kol-Fib) wiesen nach der Differenzierung mit TGF- β 3 und TGF- β 3 plus IGF-I eine unterhalb von undifferenzierten Zellen liegende Genexpression auf.

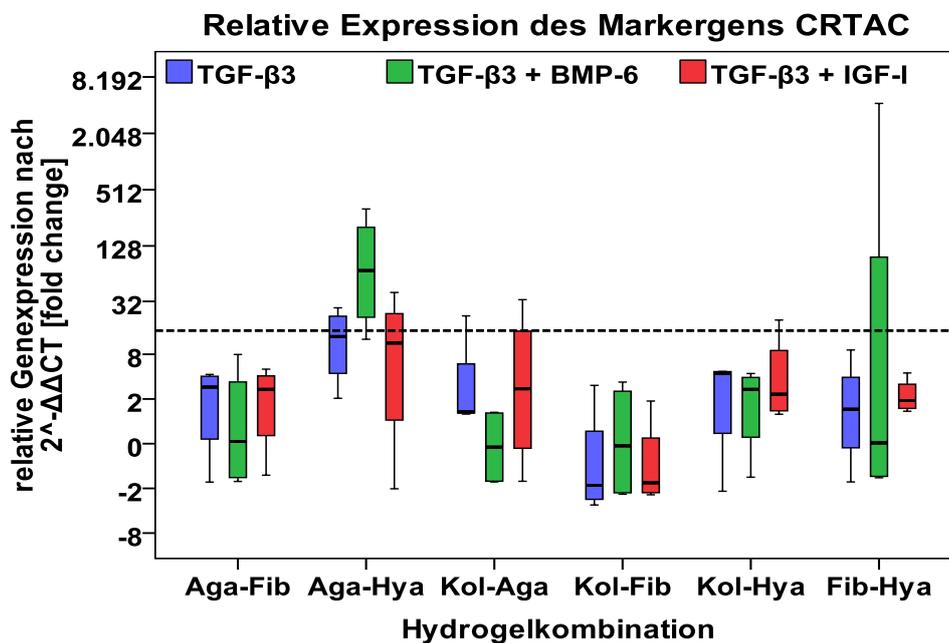


Abbildung 31: Relative Expression des Markergens „cartilage acidic protein 1“ (CRTAC) in Fettgewebstammzellen aus Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu nativen Knorpelzellen. Die Genexpression beider Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgen GAPDH normiert und auf undifferenzierte Zellen bezogen. In differenzierten Zellen der Gele aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) lag die relative Expression von CRTAC nach der Differenzierung mit TGF- β 3 plus BMP-6 oberhalb der von nativen Knorpelzellen (schwarz gestrichelte Linie). Eine Genexpression unterhalb der von Nativknorpelzellen war in den restlichen Gelkombinationen zu beobachten (n = 4).

3.3.3.4 Kollagen Typ I

Die relative Expression des Markergens Kollagen Typ I (COL1A1) ist in Abbildung 32 dargestellt. In differenzierten Zellen aller Hydrogelkombinationen bewegte sich diese oberhalb der Genexpression von nativen Knorpelzellen. Zellen der Gele aus Fibrin-Hyaluronsäure (Fib-Hya) wiesen dies nach der Differenzierung mit TGF- β 3 am deutlichsten auf. Die Expression von Kollagen Typ I bewegte sich in undifferenzierten Zellen zwischen der von Nativknorpelzellen und differenzierten Zellen.

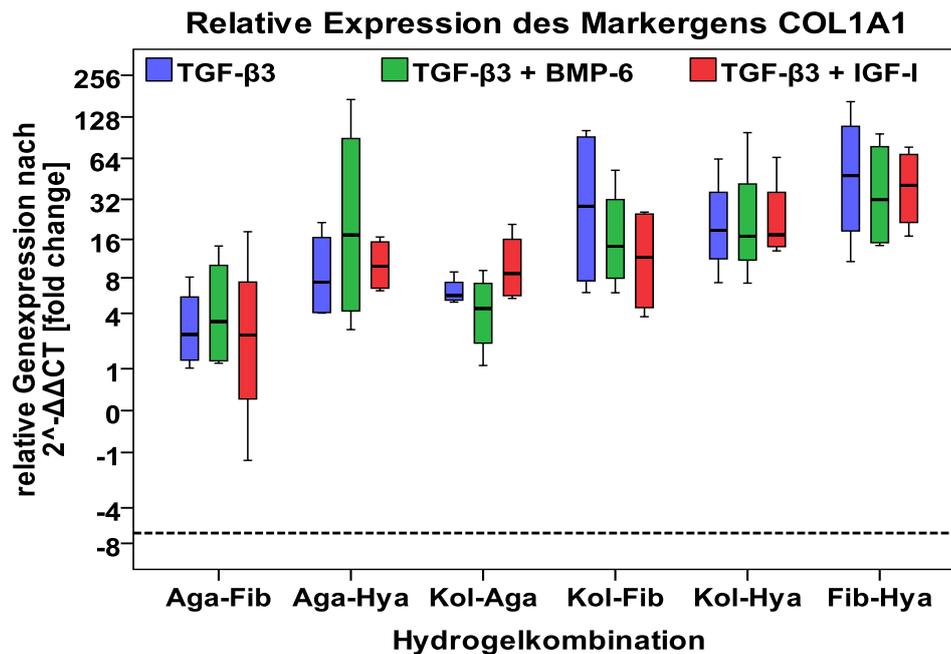


Abbildung 32: Relative Expression des Markergens Kollagen Typ I (COL1A1) in Fettgewebstammzellen aus Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu nativen Knorpelzellen. Die Genexpression beider Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgen GAPDH normiert und auf undifferenzierte Zellen bezogen. Differenzierte Zellen in Hydrogelkombinationen wiesen eine relative Genexpression auf, die oberhalb der von nativen Knorpelzellen (schwarz gestrichelte Linie) lag. In Gelen aus Fibrin-Hyaluronsäure (Fib-Hya) war dies am deutlichsten zu beobachten. Außerdem war zu erkennen, dass sich auch in undifferenzierten Zellen die relative Expression von Kollagen Typ I oberhalb von nativen Knorpelzellen bewegte (n = 4).

3.3.3.5 Kollagen Typ II

Abbildung 33 zeigt die relative Expression des Markergens Kollagen Typ II (COL2A1), die in differenzierten Zellen aller Hydrogelkombinationen unterhalb der relativen Genexpression nativer Knorpelzellen lag. Nach der Differenzierung mit TGF- β 3 plus BMP-6 kamen Zellen der Gele aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) dem Wert der Genexpression von Nativknorpel am nächsten.

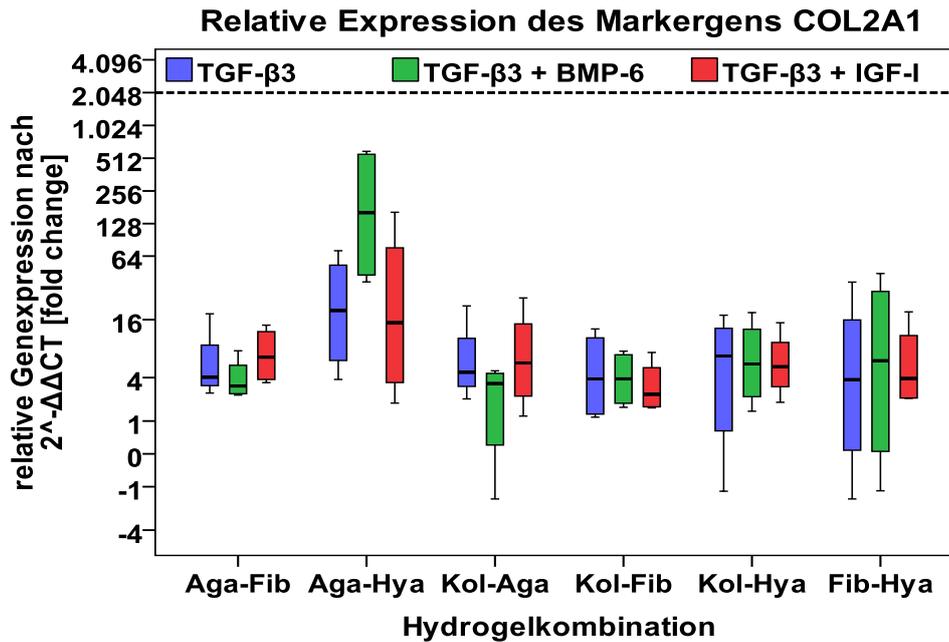


Abbildung 33: Relative Expression des Markergens Kollagen Typ II (COL2A1) in Fettgewebstammzellen aus Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu nativen Knorpelzellen. Die Genexpression beider Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgen GAPDH normiert und auf undifferenzierte Zellen bezogen. In differenzierten Zellen bewegte sich die relative Genexpression von Kollagen Typ II unterhalb der von nativen Knorpelzellen (schwarz gestrichelte Linie). Die relative Genexpression der Fettgewebstammzellen in Gelen aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) kam der von Nativknorpelzellen am nächsten (n = 4).

3.3.3.6 Kollagen Typ X

Die relative Expression des Markergens Kollagen Typ X (COL10A1) ist in Abbildung 34 dargestellt. Diese lag in differenzierten Zellen der Hydrogelkombinationen unterhalb der von nativen Knorpelzellen. Zellen der Gele aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) und Kollagen-Fibrin (Kol-Fib), die mit TGF- β 3 plus BMP-6 bzw. TGF- β 3 sowie TGF- β 3 plus BMP-6 differenziert wurden, kamen dem Wert der Genexpression von Nativknorpel am nächsten. In Kollagen-Hyaluronsäure-Gelen (Kol-Hya) lag die Genexpression nach der Differenzierung mit beiden Wachstumsfaktorkombinationen näher an nativen Knorpelzellen als nur mit TGF- β 3 alleine. Dies zeigte sich in Agarose-Hyaluronsäure-Gelen (Aga-Hya) mit TGF- β 3 plus BMP-6.

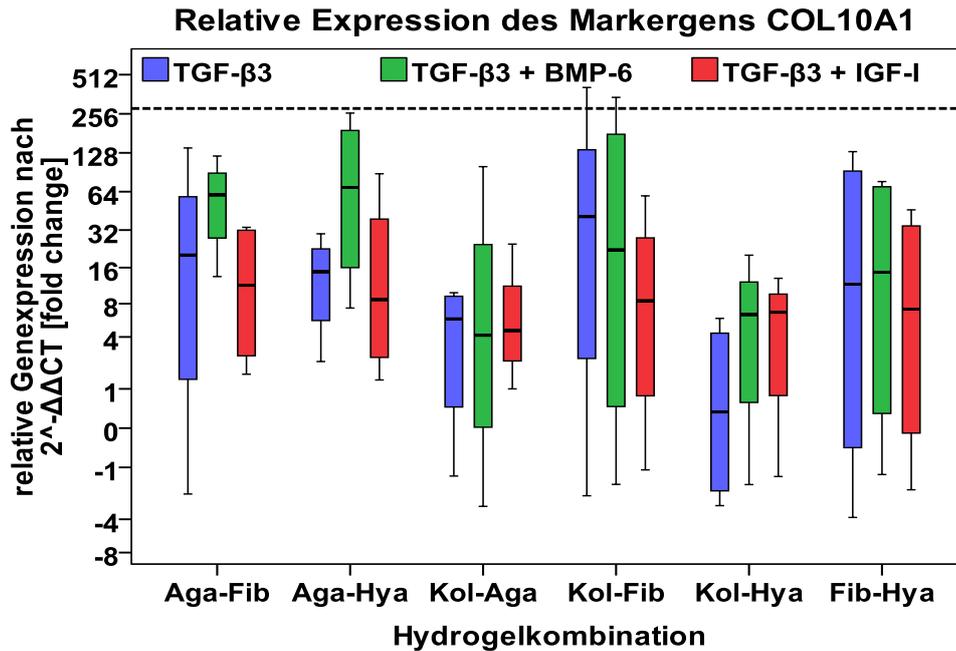


Abbildung 34: Relative Expression des Markergens Kollagen Typ X (COL10A1) in Fettgewebstammzellen aus Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu nativen Knorpelzellen. Die Genexpression beider Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgen GAPDH normiert und auf undifferenzierte Zellen bezogen. In differenzierten Zellen bewegte sich die relative Expression von Kollagen Typ X unterhalb der von nativen Knorpelzellen (schwarz gestrichelte Linie). Die relative Expression dieses Markergens kam in Zellen der Gele aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) und Kollagen-Fibrin (Kol-Fib) der Genexpression in Nativknorpelzellen am nächsten ($n = 4$).

3.3.3.7 SOX9

Abbildung 35 zeigt die relative Expression des Markergens SOX9. Diese lag nur in differenzierten Zellen der Hydrogelkombinationen Kollagen-Hyaluronsäure (Kol-Hya) und Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) nach der Differenzierung mit TGF-β3 plus BMP-6 und TGF-β3 plus IGF-I bzw. TGF-β3 plus BMP-6 oberhalb der Expression dieses Markergens in nativen Knorpelzellen. In differenzierten Fettgewebstammzellen der restlichen Hydrogelkombinationen bewegte sich die Genexpression von SOX9 unterhalb der von Nativknorpelzellen. Differenzierte Zellen in Agarose-Fibrin-Gelen (Aga-Fib) zeigten nach der Differenzierung mit TGF-β3 plus BMP-6 eine unterhalb von undifferenzierten Zellen liegende Expression von SOX9.

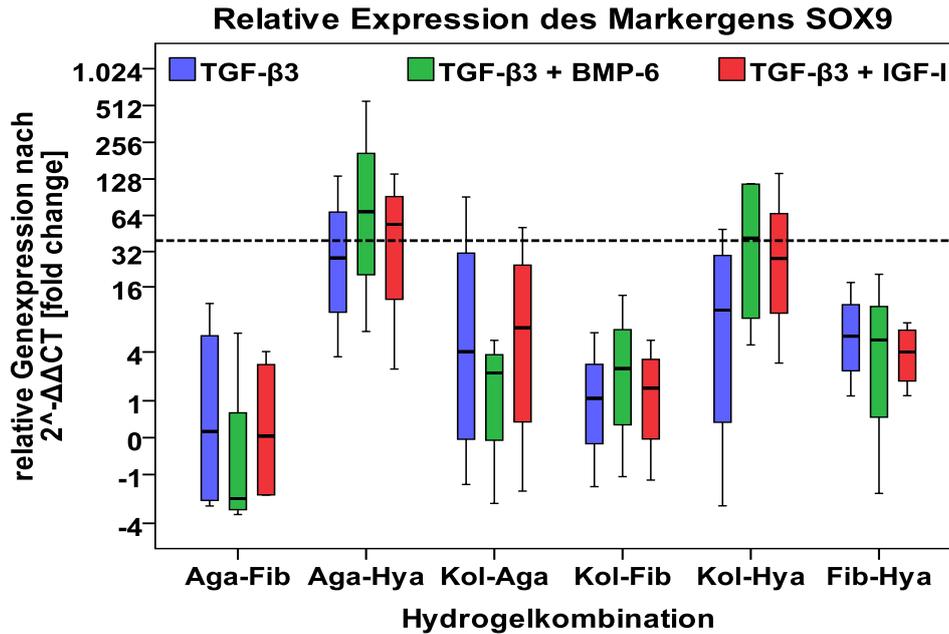


Abbildung 35: Relative Expression des Markergens SOX9 in Fettgewebstammzellen aus Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung im Vergleich zu nativen Knorpelzellen. Die Genexpression beider Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgen GAPDH normiert und auf undifferenzierte Zellen bezogen. In differenzierten Zellen der Gele aus Agarose-Hyaluronsäure (Aga-Hya) und Kollagen-Hyaluronsäure (Kol-Hya) lag die relative Expression von SOX9 zum Teil oberhalb der von nativen Knorpelzellen (schwarz gestrichelte Linie). Am deutlichsten ausgeprägt war dies in Agarose-Hyaluronsäure-Gelen (Aga-Hya). Eine Genexpression unterhalb der von Nativknorpelzellen war in den restlichen Gelkombinationen zu beobachten (n = 4).

3.4 Verhalten von zellbesiedelten Hydrogelen im *in vitro*- und im *in vivo*-Knorpeldefektmodell

3.4.1 *In vitro*-Knorpeldefektmodell mit vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten

Nach der 14-tägigen Kultivierung der Knorpelstücke zusammen mit den vordifferenzierten Fettgewebstammzellen in Hydrogelkonstrukten zeigte sich bei beiden chondrogenen Differenzierungsmedien, dass nur etwa die Hälfte der eingesetzten Gelstücke in den Defekten verblieben waren. Die restlichen Gelstücke hatten sich bereits einige Tage nach dem Einsetzen in die Defekte wieder aus diesen herausgelöst. Dies war bei beiden chondrogenen Differenzierungsmedien und unabhängig vom Trägermaterial gleichermaßen der Fall. Eine beginnende farbliche Angleichung der in den Defekten verbliebenen Gelkonstrukte an den Nativknorpel ließ eine mögliche Integration nur vermuten. Dies ist in Abbildung 36 beispielhaft für einen Spender und für die Wachstumsfaktorkombination TGF-β3 plus IGF-I illustriert.



Abbildung 36: Schweineohrknorpel mit künstlich generierten Defekten und Füllungen aus vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten nach 14-tägiger Kultivierung in chondrogenem Differenzierungsmedium. Ein Großteil der eingesetzten Hydrogelkonstrukte löste sich nach einigen Tagen nach der Füllung wieder aus den Defekten heraus. Dies war von den verwendeten Wachstumsfaktorkombinationen und Trägermaterialien unabhängig. Eine mögliche Integration der in den Defekten verbliebenen Gelkonstrukte in das native Knorpelgewebe konnte nach makroskopischer Betrachtung nicht bestätigt werden.

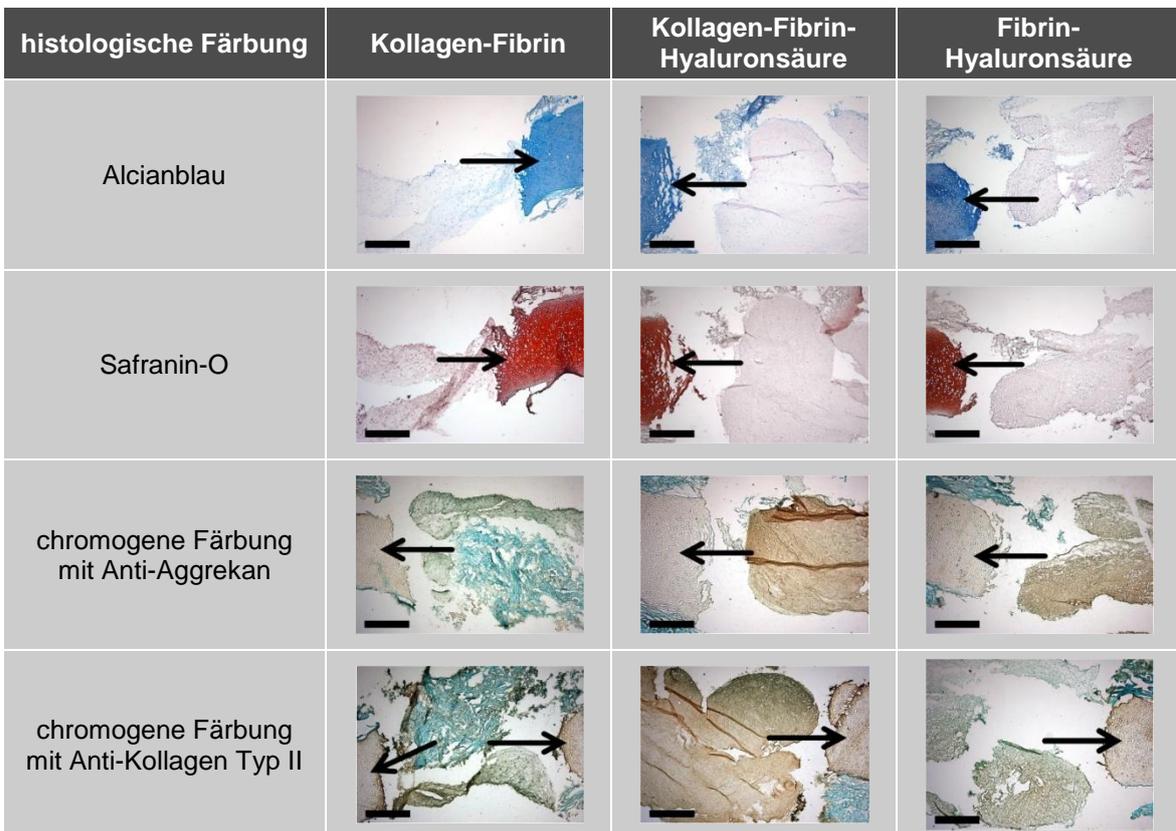


Abbildung 37: Histologische Untersuchung von vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten in künstlich generierten Schweineohrknorpeldefekten nach 14-tägiger Kultivierung in chondrogenem Differenzierungsmedium (Balken je 500 µm). Eine Integration der Gelkonstrukte in den Nativknorpel (siehe schwarze Pfeile), welcher zugleich als Positivkontrolle diente, war nicht zu beobachten. Die Färbungen Alcianblau und Safranin-O zeigten eine sehr schwache Proteoglykananreicherung in den Gelkonstrukten während die chromogenen Färbungen auf eine zum Teil starke Anreicherung von Aggrekan und Kollagen Typ II hinwiesen. Dies war vor allem bei der Gelkombination Kollagen-Fibrin-Hyaluronsäure der Fall und mit beiden Wachstumsfaktorkombinationen gleichermaßen gegeben.

Eine nähere histologische Untersuchung der Gelkonstrukte in den Knorpeldefekten bestätigte die zuvor vermutete Integration der Gelkonstrukte in den Nativknorpel in Form einer Integration nach der 14-tägigen Kultivierung nicht. Die histologischen Färbungen der Konstrukte mit der Alcianblau- und Safranin-O-Färbung zeigten durch schwache Farbtensitäten eine sehr geringe extrazelluläre Anreicherung von sauren bzw. sulfatierten Proteoglykanen in den Gelen. Nach den chromogenen Färbungen mit Anti-Aggrekan und Anti-Kollagen Typ II konnte in den Hydrogelen eine Anreicherung von Aggrekan und Kollagen Typ II durch Braunfärbung nachgewiesen werden. Deren Intensität war mit der von Nativknorpel vergleichbar und zum Teil auch stärker. Dies war vor allem bei den Gelen der Kombination Kollagen-Fibrin-Hyaluronsäure der Fall. Diese Beobachtungen nach den histologischen Färbungen waren bei den beiden verwendeten Wachstumsfaktorkombinationen gleichermaßen zu beobachten. Abbildung 37 zeigt dies beispielhaft für einen Spender und für die Wachstumsfaktorkombination TGF- β 3 plus IGF-I.

3.4.2 *In vitro*-Knorpeldefektmodell mit nicht-vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten

Während der 6-wöchigen Kultivierung der Hydrogelkonstrukte in den Knorpeldefekten mit den beiden chondrogenen Differenzierungsmedien zeigte sich schon nach einigen Tagen ein komplettes Auflösen der nicht-vordifferenzierten Hydrogelkombination aus Fibrin und Hyaluronsäure. Die anderen beiden Gelkombinationen lösten sich nicht auf und sanken in den Defekten etwas ein. Hinzu kam, dass bei diesen Gelen die ursprüngliche Undurchsichtigkeit und milchig-trübe Beschaffenheit nach der 6-wöchigen Kultivierung abnahmen. Diese Beobachtungen traten mit beiden Wachstumsfaktorkombinationen gleichermaßen auf und sind in Abbildung 38 beispielhaft für einen Spender und für die Wachstumsfaktorkombination TGF- β 3 plus IGF-I gezeigt.

Die histologische Untersuchung der nicht-vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukte in den Knorpeldefekten zeigte nach 6-wöchiger Kultivierung in beiden chondrogenen Differenzierungsmedien keine Integration der Gelkonstrukte in den angrenzenden Nativknorpel. Bei der Gelkombination aus Kollagen-Fibrin zeigten die histologischen Färbungen Alcianblau und Safranin-O sowie die chromogenen Färbungen mit Anti-Aggrekan und Anti-Kollagen Typ II innerhalb eines breiten Streifens im Bereich der Gelunterseite nur stellenweise und vereinzelt farbliche Angleichungen an Nativknorpel. Eine inhomogene und überwiegend schwache Anreicherung von Proteoglykanen, Aggrekan und Kollagen Typ II konnte nur in diesem Gelbereich nachgewiesen werden.



Abbildung 38: Schweineohrknorpel mit künstlich generierten Defekten und Füllungen aus nicht-vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten nach 6-wöchiger Kultivierung in chondrogenem Differenzierungsmedium. Hydrogele aus Fibrin-Hyaluronsäure lösten sich bereits nach einigen Tagen nach Beginn der Kultivierung vollständig auf. Bei den Gelen der anderen beiden Hydrogelkombinationen zeigte sich eine Abnahme der ursprünglichen Undurchsichtigkeit und milchig-trüben Beschaffenheit ebenso wie ein leichtes Einsinken der Gele in den Defekten. Dies zeigte sich unabhängig von der verwendeten Wachstumsfaktorkombination.

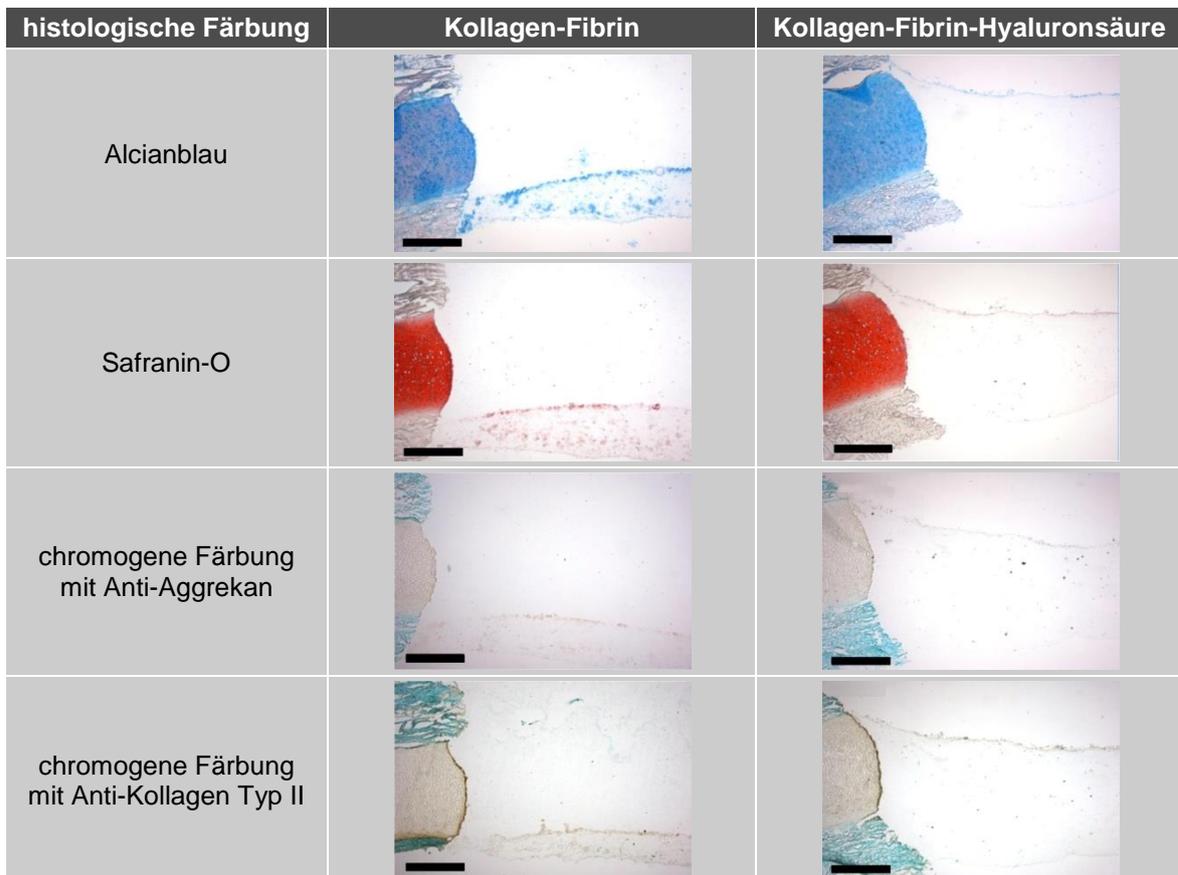


Abbildung 39: Histologische Untersuchung von nicht-vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten in künstlich generierten Schweineohrknorpeldefekten nach 6-wöchiger Kultivierung in chondrogenem Differenzierungsmedium (Balken je 500 µm). Eine Integration der Hydrogelkonstrukte in den Nativknorpel (jeweils links im Bild) war nicht zu beobachten. Die Färbungen Alcianblau und Safranin-O sowie die chromogenen Färbungen zeigten nur in einem Randbereich der Gele eine Proteoglykan-, Aggrekan- und Kollagen Typ II-Anreicherung, welche inhomogen war. Dies war bei den Hydrogelen aus Kollagen-Fibrin am deutlichsten ausgeprägt und von den verwendeten Wachstumsfaktorkombinationen unabhängig zu beobachten.

Analog hierzu zeigte sich dies mit einer deutlich niedrigeren Intensität bei der Gelkombination aus Kollagen-Fibrin-Hyaluronsäure in einem sehr schmalen Streifen am oberen Gelrand. Da sich die Gelkombination aus Fibrin-Hyaluronsäure komplett auflöste, konnte diese nicht histologisch untersucht werden. Bezüglich der Zellverteilung zeigte sich in den beiden untersuchten Gelkombinationen eine Ansiedlung im unteren Anteil der Gele. Diese Beobachtungen waren von den verwendeten Wachstumsfaktorkombinationen unabhängig. Abbildung 39 zeigt dies beispielhaft für einen Spender und für die Wachstumsfaktorkombination TGF- β 3 plus IGF-I.

3.4.3 *In vivo*-Knorpeldefektmodell mit vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten

Nach der Besiedlung mit Kaninchen-Fettgewebstammzellen und der anschließenden 14-tägigen chondrogenen Differenzierung erwiesen sich agarosehaltige Hydrogelkombinationen als form- und volumenstabil, während agarosefreie Gelkombinationen innerhalb weniger Tage stark schrumpften (siehe Abbildung 40). Dies trat mit beiden verwendeten Wachstumsfaktorkombinationen gleichermaßen auf.

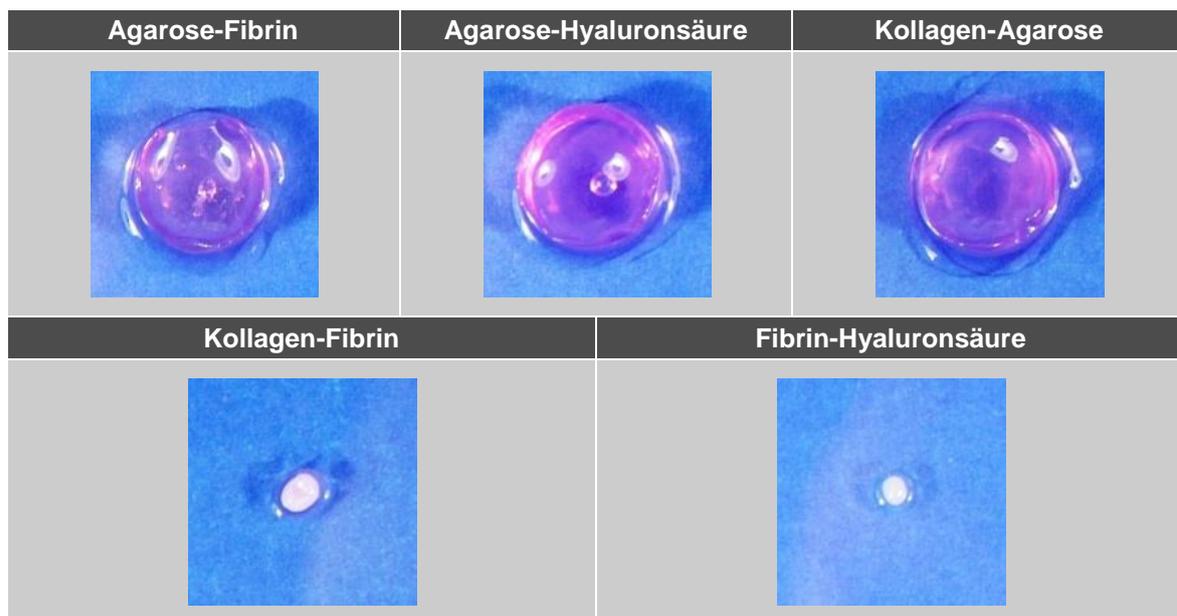


Abbildung 40: Mit Kaninchen-Fettgewebstammzellen besiedelte Hydrogelkombinationen nach 14-tägiger Kultivierung in chondrogenem Differenzierungsmedium. Agarosefreie Hydrogelkombinationen schrumpften stark während sich agarosehaltige Gele als volumen- und formstabil erwiesen (ursprünglicher Geldurchmesser = 15 mm).

Die histologische Untersuchung der implantierten vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukte mit den Färbungen Alcianblau und Safranin-O zeigte 3 und 6 Wochen nach der Implantation, dass keines der implantierten Gelkonstrukte vollständig in die Knorpeldefekte integrierte.

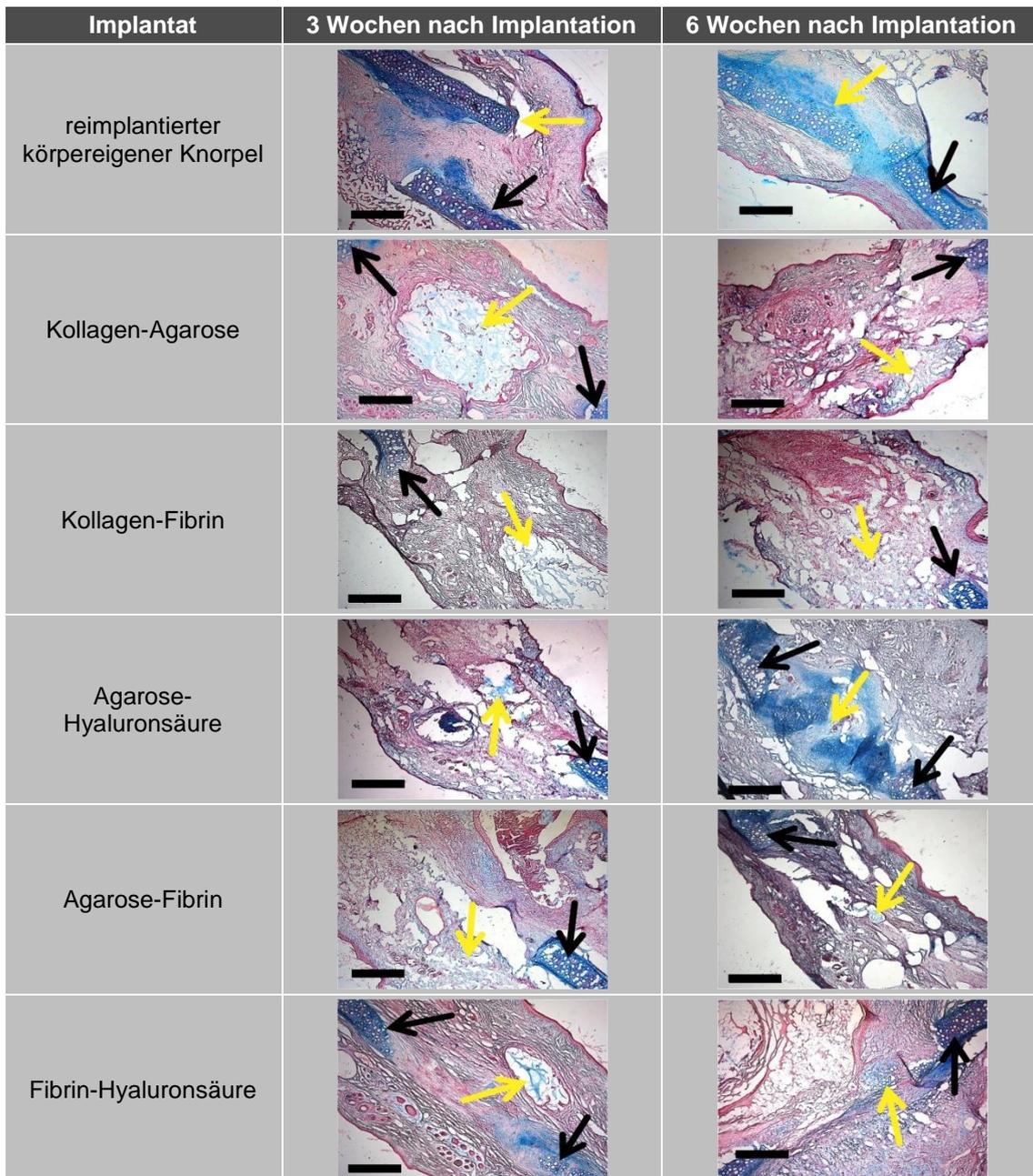


Abbildung 41: Histologische Untersuchung mit der Alcianblau-Färbung von vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten nach 3 und 6 Wochen nach der Implantation in Kaninchen-Ohrmuschelknorpeldefekte (Balken je 500 μm , schwarze Pfeile zeigen Nativknorpel, gelbe Pfeile zeigen Implantate oder Implantatreste). Bei keinem der implantierten Gelkonstrukte kam es zu einer vollständigen Integration in den Nativknorpel oder zu einer Defektdeckung. Reimplantierte, körpereigene Knorpelstücke zeigten Anzeichen einer beginnenden Integration. Einige der implantierten Gelkonstrukte waren bereits nach 3 Wochen nach der Implantation im Nativgewebe nur noch stellenweise auszumachen. Vereinzelt waren größere und kleinere Gelreste von kollagen- und agarosehaltigen Gelkonstrukten nach 6 Wochen noch nachweisbar. Positive Alcianblau-Färbungen gaben Hinweise auf einen möglichen Umbau der Hydrogelkonstrukte in das Bindegewebe sowie auf die Bildung von Faserknorpel. Diese Beobachtungen waren von den für die Vordifferenzierung verwendeten Wachstumsfaktorkombinationen unabhängig.

Im Kontrast hierzu war beim zur Kontrolle reimplantierten, körpereigenen Knorpel schon nach 3 Wochen eine beginnende Integration zu beobachten. Dies war als eine sich aufbauende, proteoglykanreiche Verbindung zwischen den jeweiligen Endstücken von Nativknorpel und Knorpelimplantat zu sehen. Kollagenhaltige Gelkonstrukte waren nach 3 Wochen noch gut auszumachen, während von kollagenfreien Gelen vereinzelt noch minimale Reste im Bindegewebe nachweisbar waren. Auch nach 6 Wochen waren von allen Gelkombinationen noch Gelreste im Bindegewebe zu erkennen. Positive Alcianblau-Färbungen ließen nach 6 Wochen einen Umbau der Hydrogelimplantate in Bindegewebe sowie die Bildung von Faserknorpel vermuten. Eine beginnende Integration in den Nativknorpel konnte bei der Gelkombination Agarose-Hyaluronsäure beobachtet werden. Bei einigen Konstruktresten sowie beim reimplantierten Knorpel zeigte sich zusätzlich, dass diese bezüglich ihrer ursprünglichen Position der Implantation verschoben waren. Dies war von den für die Vordifferenzierung der Gelkonstrukte verwendeten Wachstumsfaktorkombinationen unabhängig und ist beispielhaft für zwei Kaninchen und für die Wachstumsfaktorkombination TGF- β 3 plus IGF-I nach der Alcianblau-Färbung in Abbildung 41 dargestellt. Nativknorpel ist mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet, während Implantate oder deren Reste im Bindegewebe mit gelben Pfeilen gezeigt werden.

3.5 Einfluss der Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Biologie und Physiologie von Fettgewebstammzellen

3.5.1 Proliferation, Migration und Koloniebildung

3.5.1.1 Proliferationsassay

Abbildung 42 zeigt das Proliferationsverhalten unmarkierter und VSOP-markierter ASC. Nach der Markierung mit VSOP im Konzentrationsbereich 1,5 μ M bis 1,5 mM zeigten die markierten Zellen im Vergleich zu den unmarkierten Zellen in einem 11-tägigen Zeitraum keinen signifikanten Unterschied im Proliferationsverhalten.

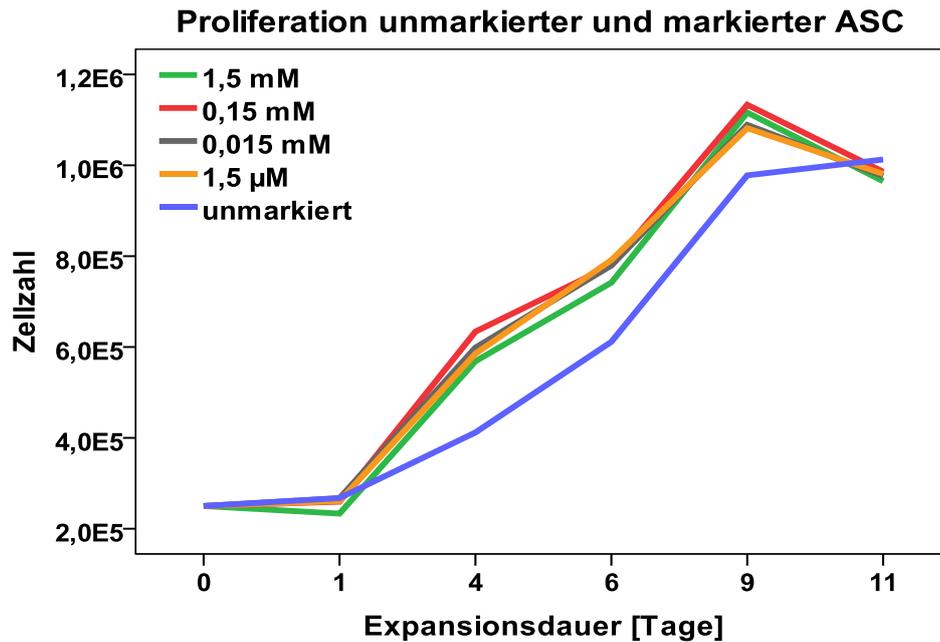


Abbildung 42: Proliferation von unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen im Vergleich. Das Proliferationsverhalten zwischen unmarkierten und VSOP-markierten ASC wies im exakten Friedman-Test keine signifikanten Unterschiede auf ($n = 8$).

3.5.1.2 Scratch-Assay

Der Wundverschluss unmarkierter und VSOP-markierter ASC im Scratch-Assay ist in Abbildung 43 zu sehen.

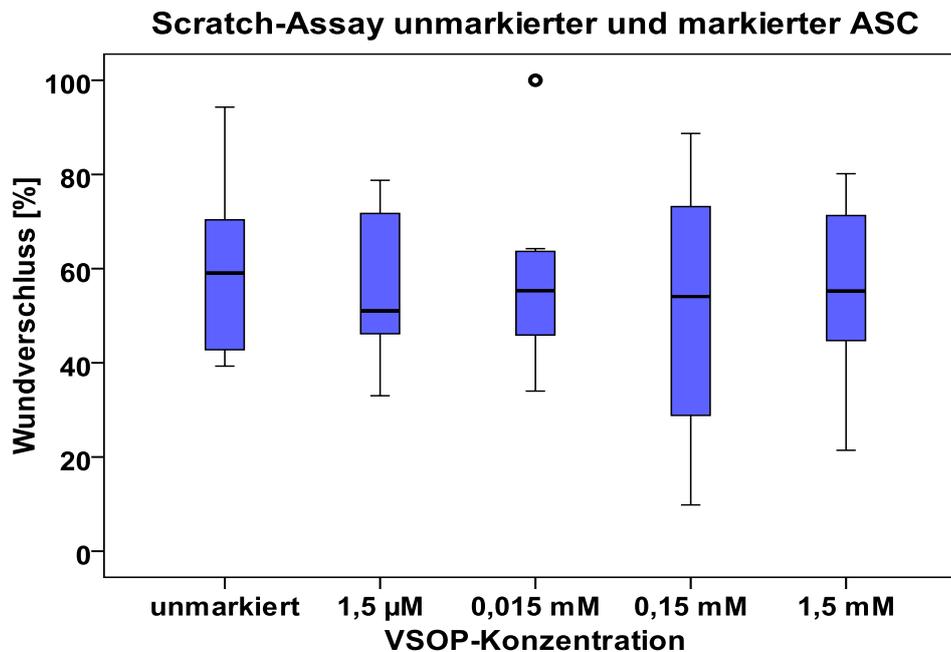


Abbildung 43: Scratch-Assay zur Untersuchung der Zellmigration von unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen im Vergleich. 24 h nach der Wundherzeugung im Zellrasen war bei unmarkierten und markierten Zellen ein miteinander vergleichbarer Wundverschluss von 50 bis 60% zu beobachten. Mit dem exakten Friedman-Test war kein signifikanter Unterschied nachweisbar ($n = 8$).

Beim Scratch-Assay zeigten markierte Fettgewebstammzellen 24 Stunden nach der Markierung mit VSOP im selben Konzentrationsbereich wie beim Proliferationsassay eine Migration der Zellen in das Innere der künstlich erzeugten Wunden im Zellrasen. Diese war unabhängig von der VSOP-Konzentration mit dem Wundverschluss von unmarkierten Zellen vergleichbar. Ein näheres Ausmessen der Wunden am Zeitpunkt 0 und nach 24 Stunden ergab für alle VSOP-Konzentrationen sowie für unmarkierte Zellen einen Wundverschluss von 50 bis 60%. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

3.5.1.3 Koloniebildungsassay

Mit dem Koloniebildungsassay konnte 14 Tage nach der Markierung von Fettgewebstammzellen mit 1,5 mM VSOP im Vergleich zu unmarkierten Zellen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl gebildeter Kolonien festgestellt werden (siehe Abbildung 44).

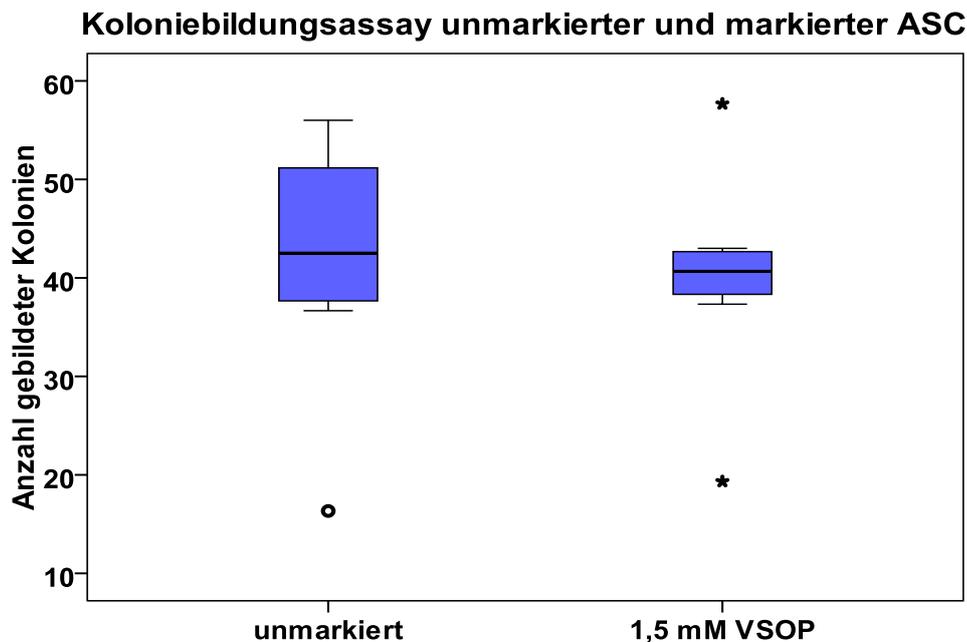


Abbildung 44: Koloniebildungsassay zur Untersuchung der Koloniebildung von unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen nach 14 Tagen im Vergleich. Zwischen markierten und unmarkierten Zellen konnte im Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied in der Anzahl gebildeter Kolonien ermittelt werden (n = 8).

3.5.2 Multidifferenzierungspotential

3.5.2.1 Histologischer Nachweis der Differenzierung

In Kapitel 3.2 wurde das Multidifferenzierungspotential für unmarkierte Fettgewebstammzellen mittels histologischer Färbungen bereits gezeigt (siehe Abbildung 19). In nahezu identischer Weise konnten bei markierten ASC der VSOP-Konzentration 1,5 mM intrazelluläre Lipidvakuolen nach adipogener Differenzierung,

extrazelluläre Calciumablagerungen nach osteogener Differenzierung sowie Proteoglykan- und Kollagenanreicherungen nach chondrogener Differenzierung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 45 A-F). Das Multidifferenzierungspotential von markierten und unmarkierten ASC war nach der qualitativen Beurteilung durch die histologischen Nachweise miteinander vergleichbar.

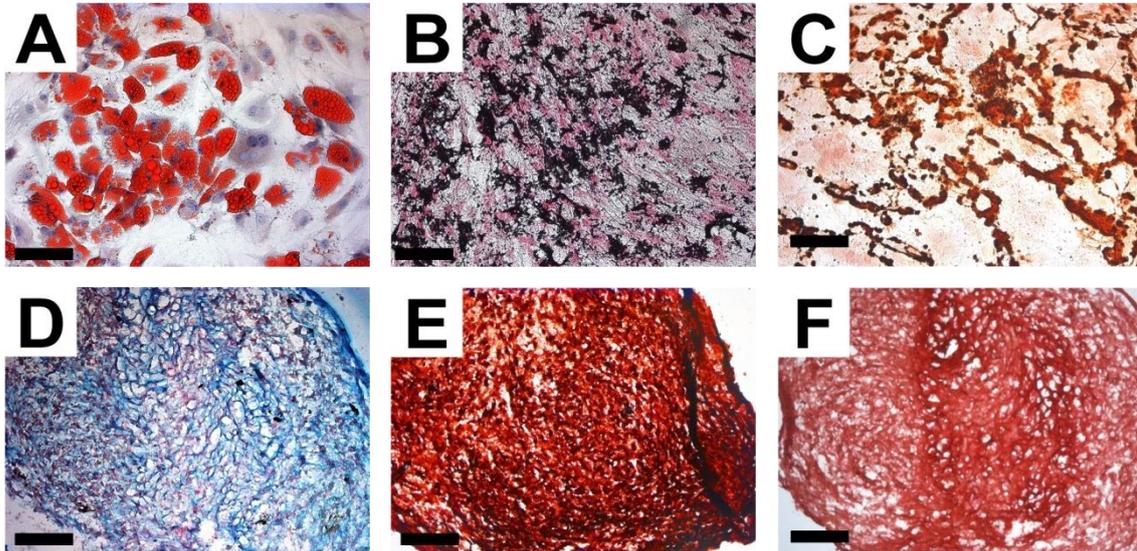


Abbildung 45: Histologischer Nachweis des Multidifferenzierungspotentials von VSOP-markierten Fettgewebstammzellen. Intrazelluläre Lipidvakuolen (A), extrazelluläre Calciumablagerungen (B und C), Proteoglykan- (D und E) und Kollagenanreicherungen (F) konnten bei markierten Zellen nach adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierung mittels histologischer Färbungen nachgewiesen werden (Balken je 100 μm).

3.5.2.2 Biochemischer Nachweis der Differenzierung

Beim Vergleich des DNA-Gehalts zwischen unmarkierten und markierten Fettgewebstammzellen der VSOP-Konzentration 1,5 mM aus hochdichten Zellkugeln zeigte sich nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung kein signifikanter Unterschied im DNA-Gehalt (siehe Abbildung 46).

Ein signifikanter Unterschied konnte auch beim Vergleich des Kollagengehalts zwischen unmarkierten und VSOP-markierten ASC nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 47). Der DNA-Gehalt und die Kollagenanreicherung beider ASC-Gruppen waren somit vergleichbar.

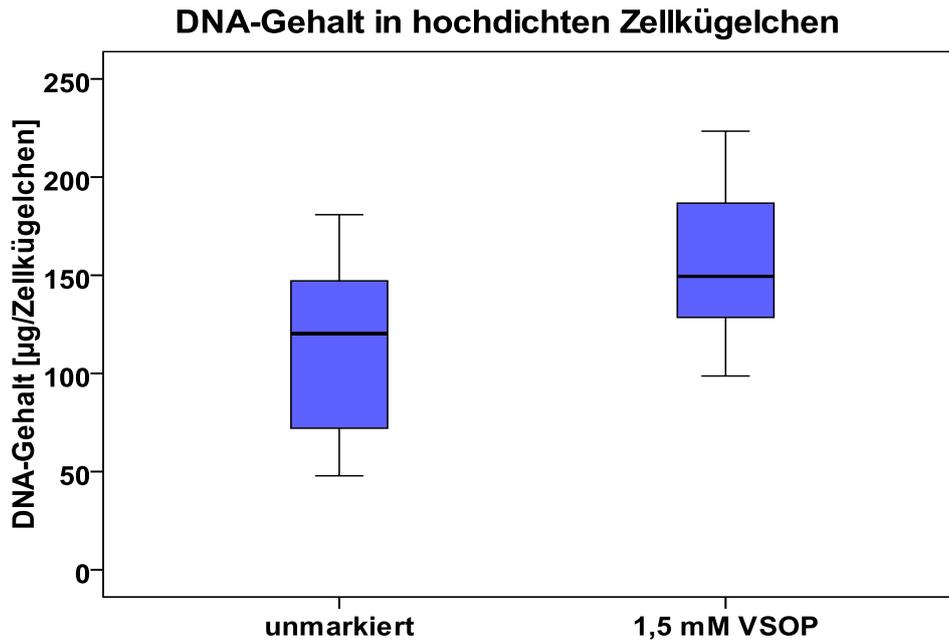


Abbildung 46: Vergleich des DNA-Gehalts zwischen unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen in hochdichten Zellkugeln nach 21-t\u00e4giger chondrogener Differenzierung. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im DNA-Gehalt zwischen beiden ASC-Gruppen im Wilcoxon-Test ($n = 8$).

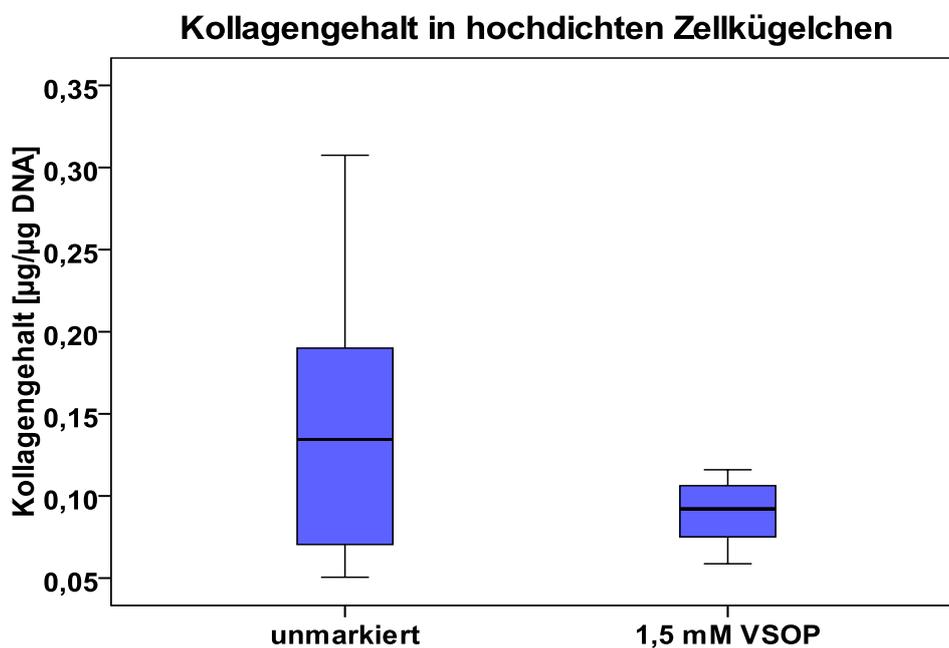


Abbildung 47: Vergleich des Kollagengehalts zwischen unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen in hochdichten Zellkugeln nach 21-t\u00e4giger chondrogener Differenzierung. Ein signifikanter Unterschied in der Kollagenanreicherung zwischen beiden ASC-Gruppen konnte im Wilcoxon-Test nicht nachgewiesen werden ($n = 8$).

Der Glykosaminoglykangehalt zeigte beim Vergleich zwischen unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen aus den hochdichten Zellkugeln einen signifikanten Unterschied im Wilcoxon-Test. Unmarkierte ASC wiesen eine höhere Glykosaminoglykananreicherung als markierte Zellen auf (siehe Abbildung 48).

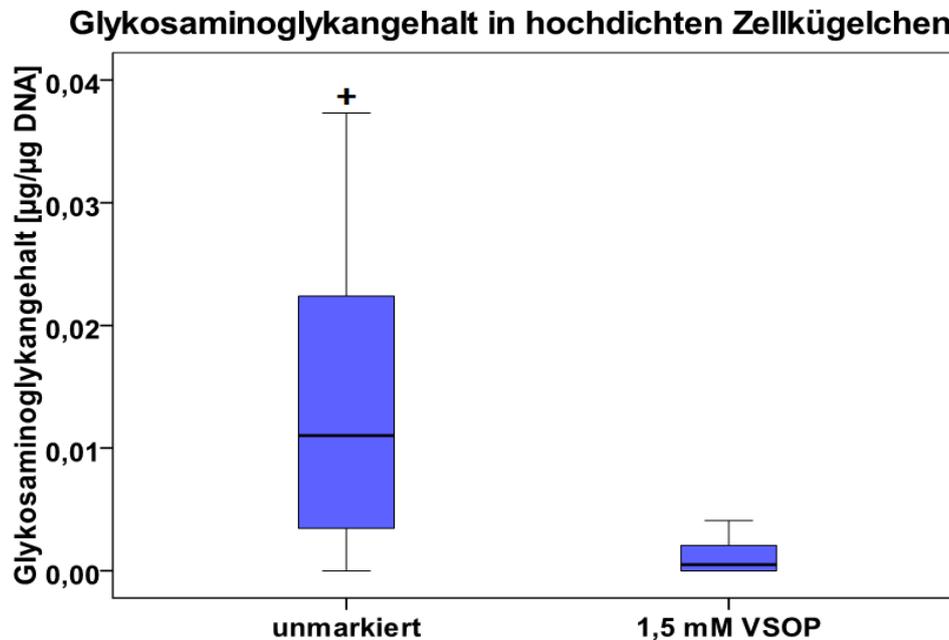


Abbildung 48: Vergleich des Glykosaminoglykangehalts zwischen unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen in hochdichten Zellkugeln nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung. Unmarkierte Zellen wiesen im Wilcoxon-Test einen signifikant höheren Glykosaminoglykangehalt als markierte Zellen auf (n = 8).

3.5.2.3 Expression gewebespezifischer Markergene

Die Expression gewebespezifischer Markergene in unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen wurde auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert und anschließend auf die Expression derselben Markergene in undifferenzierten Zellen bezogen. Der Wert 0 stellt die relative Genexpression in undifferenzierten Zellen dar. Nach adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierung zeigten sowohl unmarkierte als auch mit 1,5 mM VSOP markierte Fettgewebstammzellen die Expression der spezifischen Markergene für Fett (FABP4, LEP, LPL), Knochen (ALPL, BGLAP, RUNX2) und Knorpel (ACAN, COL2A1, CRTAC, SOX9). Ein Vergleich der relativen Expression der Markergene zwischen beiden ASC-Gruppen wies keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Abbildung 49). In unmarkierten und markierten ASC war nach adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierung bezüglich der gewebespezifischen Markergenexpression ein miteinander vergleichbares Multidifferenzierungspotential zu sehen.

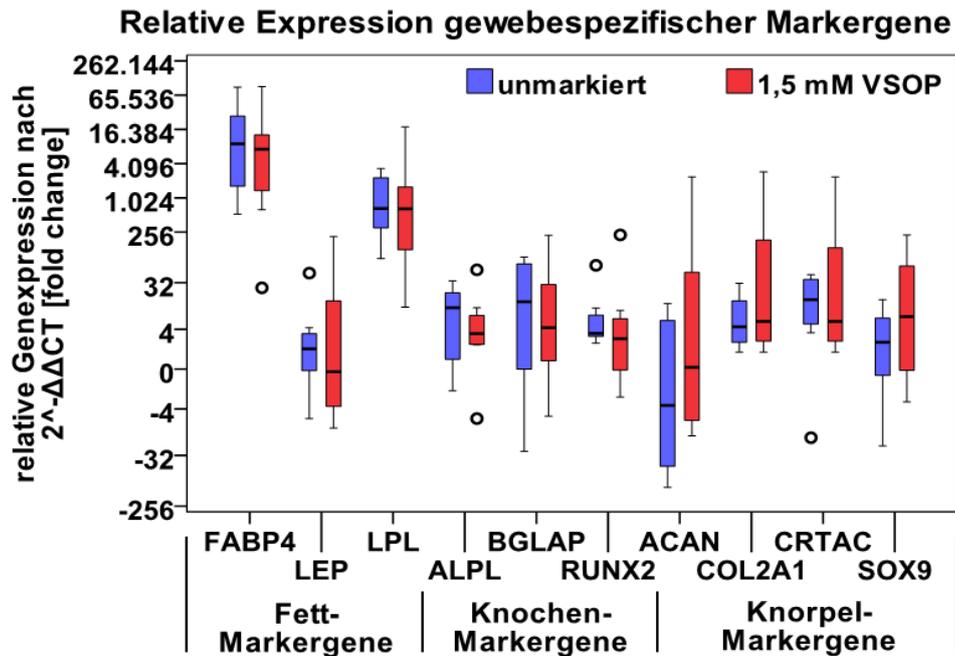


Abbildung 49: Relative Expression gewebespezifischer Markergene in unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen nach adipogener, osteogener und chondrogener Differenzierung. Die Genexpression in beiden Zellgruppen wurde auf die des Haushaltsgens GAPDH normiert und auf undifferenzierte ASC bezogen. Ein Vergleich der relativen Expression spezifischer Markergene für Fett (FABP4, LEP, LPL), Knochen (ALPL, BGLAP, RUNX2) und Knorpel (ACAN, COL2A1, CRTAC, SOX9) in unmarkierten und VSOP-markierten ASC zeigte keine signifikanten Unterschiede im Wilcoxon-Test. Das Multidifferenzierungspotential von markierten und unmarkierten ASC war bezüglich der Expression der gewebespezifischen Markergene miteinander vergleichbar (n = 8).

3.5.3 Vitalität und genomische Stabilität

3.5.3.1 Trypanblau-Ausschlusstest

Im Trypanblau-Ausschlusstest zeigten Fettgewebstammzellen nach der Markierung mit VSOP im Konzentrationsbereich 1,5 μM bis 1,5 mM im Vergleich zu unmarkierten Zellen keine signifikanten Abweichungen in der Vitalität (siehe Abbildung 50). Unmarkierte und markierte ASC wiesen somit eine miteinander vergleichbare Vitalität auf.

Trypanblau-Ausschlusstest unmarkierter und markierter ASC

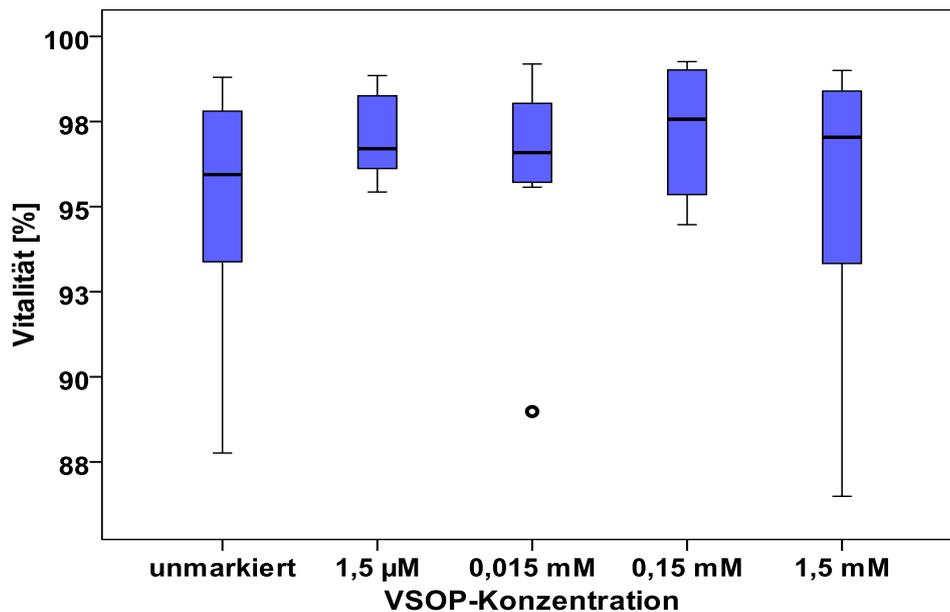


Abbildung 50: Trypanblau-Ausschlusstest zur Untersuchung der Vitalität von unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen. Im Wilcoxon-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Vitalität zwischen unmarkierten und markierten ASC ($n = 8$).

3.5.3.2 MTT-Assay

In einem 72-stündigen Zeitraum nach der Markierung mit VSOP im Konzentrationsbereich 1,5 µM bis 1,5 mM zeigten Fettgewebstammzellen im MTT-Assay keine signifikante Veränderung der Vitalität (siehe Abbildung 51). Dies war bei allen VSOP-Konzentrationen gleichermaßen zu beobachten. Die Unterschiede der Vitalitäten markierter Zellen innerhalb eines Zeitpunkts waren zwischen den Konzentrationen im exakten Friedman-Test ebenfalls nicht signifikant. ASC, die zur Kontrolle mit 3 mM t-BHP behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu markierten Zellen eine durchgehend niedrige Vitalität auf. Innerhalb von 72 Stunden wiesen markierte ASC aller VSOP-Konzentrationen einen vergleichbaren Verlauf der Vitalität auf.

Ebenso zeigten Fettgewebstammzellen im MTT-Assay in einem 28-tägigen Zeitraum nach der Markierung mit 1,5 mM VSOP einen nahezu konstanten Vitalitätsverlauf ohne signifikante Veränderungen im exakten Friedman-Test (siehe Abbildung 52). ASC der Positivkontrolle, welche vor jedem Zeitpunkt über Nacht mit 0,1 mM t-BHP behandelt wurden, ließen im Vergleich zu markierten Zellen eine durchgehend niedrige Vitalität erkennen. Somit war auch 28 Tage nach der Markierung keine Veränderung im Vitalitätsverlauf von VSOP-markierten ASC gegeben.

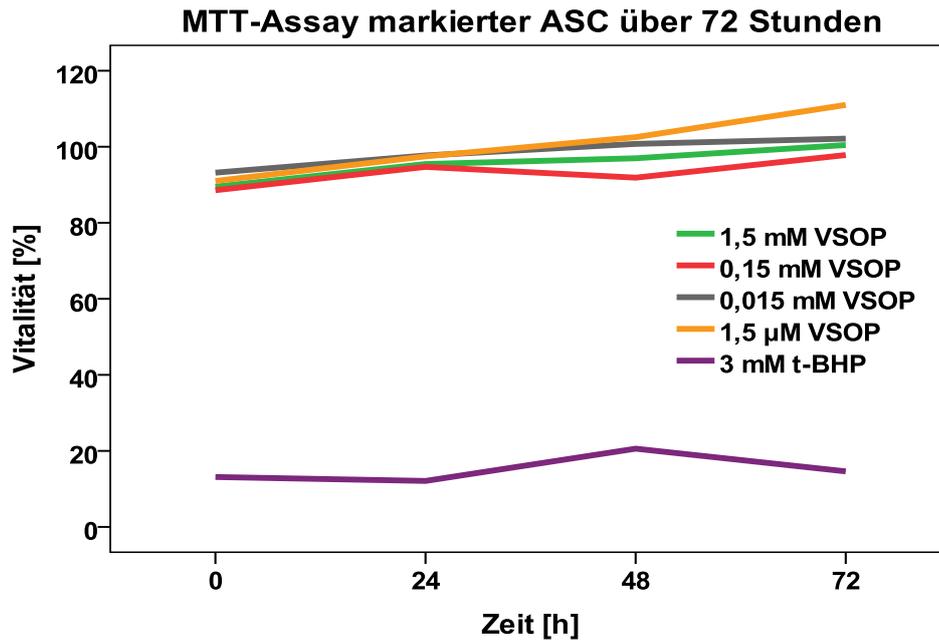


Abbildung 51: MTT-Assay über 72 Stunden zur Untersuchung der Zellvitalität von VSOP-markierten und mit t-BHP behandelten Fettgewebstammzellen. Es zeigte sich im exakten Friedman-Test keine signifikante Veränderung der Vitalität markierter Zellen aller VSOP-Konzentrationen. Die Vitalität der mit t-BHP behandelten Zellen war durchgehend erniedrigt. Markierte Zellen wiesen im Untersuchungszeitraum unabhängig von der VSOP-Konzentration einen vergleichbaren Vitalitätsverlauf auf (n = 6).

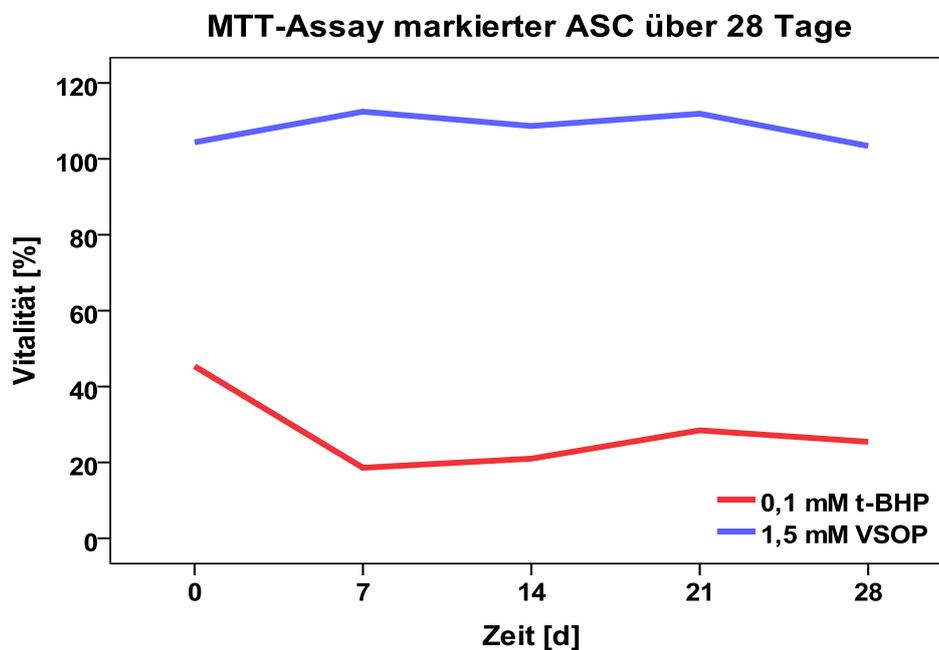


Abbildung 52: MTT-Assay über 28 Tage zur Untersuchung der Zellvitalität von VSOP-markierten und mit t-BHP behandelten Fettgewebstammzellen. Der Vitalitätsverlauf markierter ASC zeigte auch 28 Tage nach der Markierung keine signifikanten Veränderungen. Die Vitalität der mit t-BHP behandelten Zellen zeigte sich durchgehend erniedrigt (n = 6).

3.5.3.3 Annexin V-Test

Die Bestimmung der Anteile apoptotischer Zellen mit dem Annexin V-Test zeigte bei Fettgewebstammzellen nach der Markierung mit VSOP im Konzentrationsbereich 1,5 μM bis 1,5 mM sowie bei unmarkierten Zellen in einem 72-stündigen Zeitraum keine signifikante Veränderung des Anteils apoptotischer Zellen. Mit 3 mM t-BHP behandelte Zellen der Positivkontrolle zeigten durchgehend den höchsten Anteil an apoptotischen Zellen (siehe Abbildung 53). Im Zeitverlauf von 72 Stunden war der Verlauf der Anteile an apoptotischen Zellen zwischen unmarkierten und markierten ASC vergleichbar.

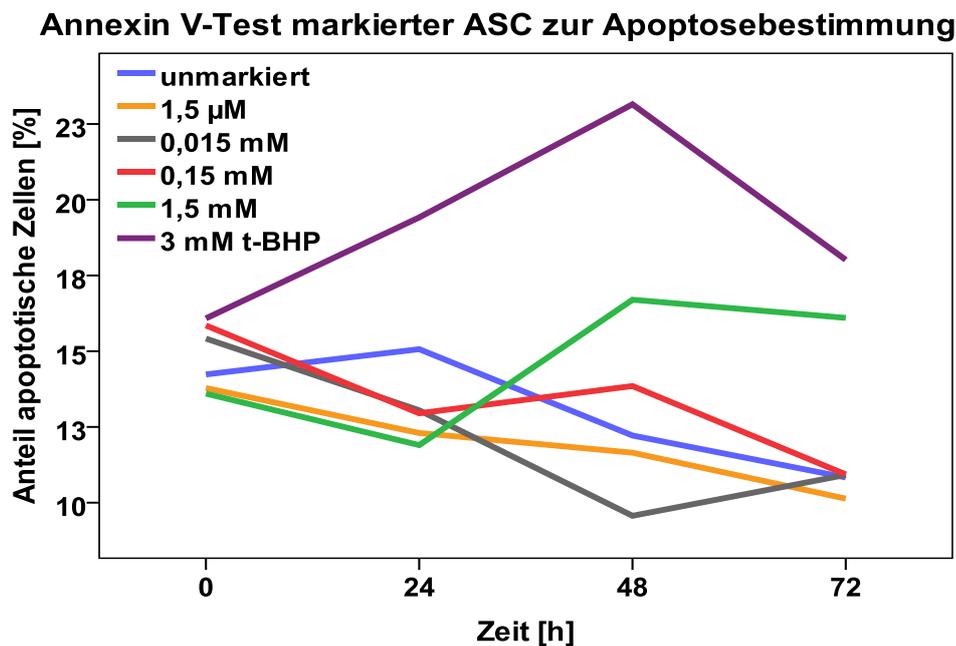


Abbildung 53: Annexin V-Test zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen von unmarkierten, VSOP-markierten und mit t-BHP behandelten Fettgewebstammzellen. In einem 72-stündigen Zeitraum nach der Markierung mit VSOP konnte bei unmarkierten und markierten Zellen im exakten Friedman-Test keine signifikante Veränderung der Anteile apoptotischer Zellen beobachtet werden. Mit t-BHP behandelte Zellen zeigten durchgehend den höchsten Anteil apoptotischer Zellen. Die Anteile apoptotischer Zellen waren zwischen unmarkierten und markierten ASC miteinander vergleichbar ($n = 6$).

Bei der Bestimmung der Anteile nekrotischer Zellen zeigten unmarkierte und VSOP-markierte Fettgewebstammzellen über denselben Zeitraum nach der Markierung keine Veränderung des Anteils nekrotischer Zellen. Mit 3 mM t-BHP behandelte ASC der Positivkontrolle wiesen durchgehend den höchsten Anteil an nekrotischen Zellen auf (siehe Abbildung 54). Analog zur Apoptosebestimmung konnte hier im Zeitverlauf von 72 Stunden zwischen markierten und unmarkierten ASC kein Unterschied im Anteil nekrotischer Zellen beobachtet werden.

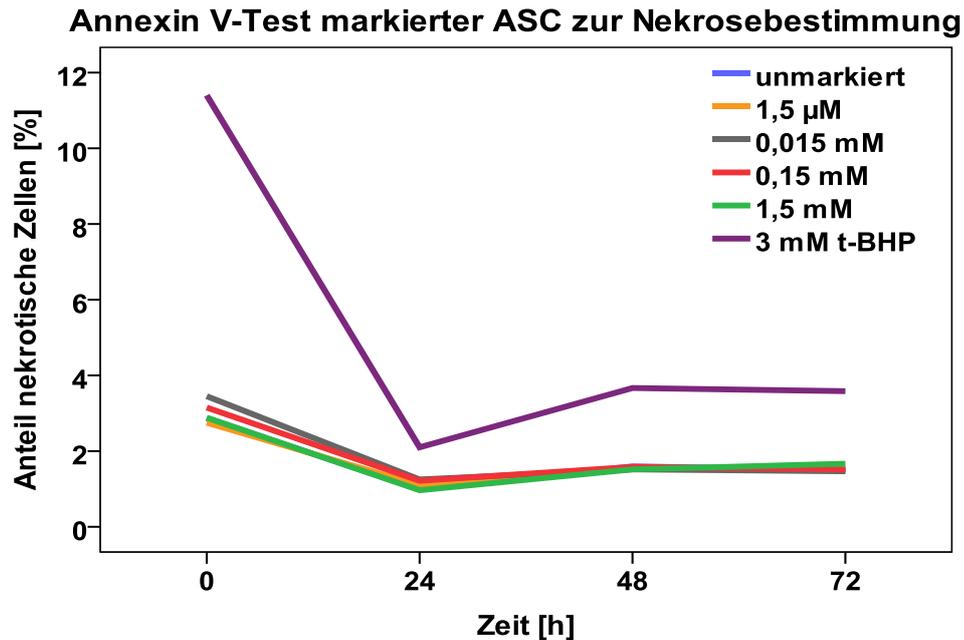


Abbildung 54: Annexin V-Test zur Bestimmung des Anteils nekrotischer Zellen von unmarkierten, VSOP-markierten und mit t-BHP behandelten Fettgewebstammzellen. Markierte und unmarkierte Zellen zeigten in einem 72-stündigen Zeitraum nach der Markierung keinen signifikanten Unterschied im Anteil nekrotischer ASC. Zellen, die mit t-BHP behandelt wurden, wiesen durchgehend den höchsten Anteil nekrotischer Zellen auf. Die Anteile nekrotischer Zellen zwischen markierten und unmarkierten ASC waren miteinander vergleichbar (n = 6).

3.5.3.4 Chromosomenaberrationstest

Nach der Markierung von Fettgewebstammzellen mit VSOP im Konzentrationsbereich 1,5 µM bis 1,5 mM zeigten markierte Zellen im Chromosomenaberrationstest eine Zunahme der Chromosomenaberrationen mit steigender VSOP-Konzentration. Zellen der Positivkontrolle, welche mit 100 µM MMS behandelt wurden, wiesen die höchste Anzahl an Aberrationen auf (siehe Abbildung 55). Im Vergleich zu unmarkierten Zellen, bei denen die Anzahl der Aberrationen am niedrigsten war, erwies sich die Zunahme der Aberrationen für die VSOP-Konzentration 1,5 mM sowie für die Positivkontrolle als signifikant (exakter Friedman-Test und Wilcoxon-Test). Insgesamt setzten sich die erfassten Aberrationen aus 78,01% Chromosomenbrüchen, 21,21% Chromatidbrüchen und 0,76% Reunionen zusammen.

Chromosomenaberrationstest unmarkierter und markierter ASC

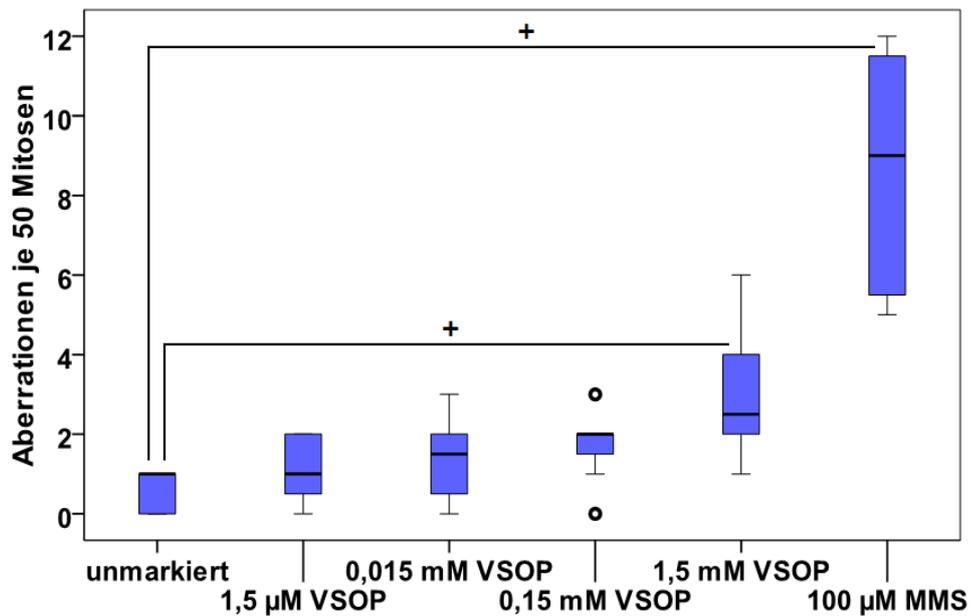


Abbildung 55: Chromosomenaberrationstest zur Erfassung von Chromosomenaberrationen in unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen. Es zeigte sich eine Zunahme der Aberrationen mit steigender VSOP-Konzentration. Im Vergleich zu unmarkierten Zellen war diese Zunahme für die VSOP-Konzentration 1,5 mM signifikant. Zellen der Positivkontrolle, welche mit MMS behandelt wurden, wiesen die meisten Aberrationen auf ($n = 8$).

3.5.3.5 Comet-Assay

Analog zum Chromosomenaberrationstest zeigte sich beim Comet-Assay in Fettgewebstammzellen, welche mit denselben VSOP-Konzentrationen markiert wurden, eine Zunahme der DNA-Fragmentierung mit steigender VSOP-Konzentration. Diese war in unmarkierten Zellen am niedrigsten und in Zellen der Positivkontrolle nach der Behandlung mit 200 µM MMS am höchsten (siehe Abbildung 56). Hier war die Zunahme der DNA-Fragmentierung bei der VSOP-Konzentration 1,5 mM sowie bei der Positivkontrolle im Vergleich zu unmarkierten Zellen ebenfalls signifikant (exakter Friedman-Test und Wilcoxon-Test).

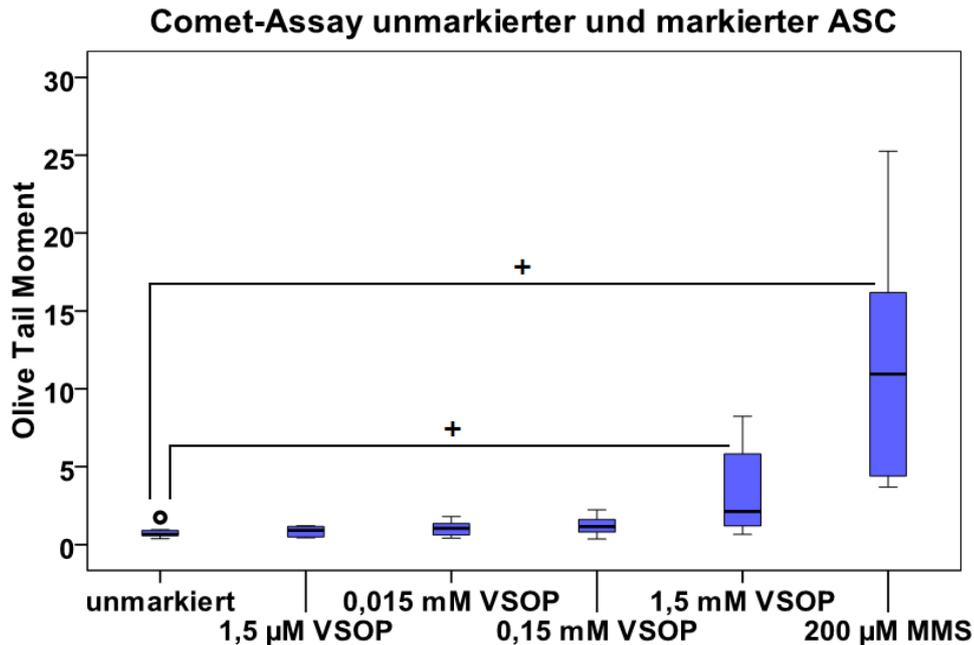


Abbildung 56: Comet-Assay zur Erfassung der DNA-Fragmentierung in unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen. Es zeigte sich eine Zunahme der DNA-Fragmentierung mit steigender VSOP-Konzentration. Im Vergleich zu unmarkierten Zellen war diese Zunahme für die VSOP-Konzentration 1,5 mM signifikant. Die höchste DNA-Fragmentierung konnte bei den Zellen der Positivkontrolle, die mit MMS behandelt wurden, beobachtet werden (n = 8).

3.5.4 Genexpression von Entzündungs-, Angiogenese- und Apoptosemarkern

Die Expression der spezifischen Markergene in unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen wurde auf die Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Anschließend wurde die Genexpression in markierten Zellen auf die Expression derselben Markergene in unmarkierten Zellen bezogen. Der Wert 0 stellt die relative Genexpression in unmarkierten Zellen dar. Diese ist in Abbildung 57 dargestellt. In einem 28-tägigen Zeitfenster nach der Markierung von ASC mit 1,5 mM VSOP wies die Genexpression der Entzündungsmarker Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8), des Apoptosemarkers Caspase 3 (CASP3) sowie des Angiogenesemarkers „vascular endothelial growth factor A“ (VEGFA) in markierten Zellen in Relation zu unmarkierten Zellen keine signifikante Veränderung (exakter Friedman-Test) im Zeitverlauf auf.

Relative Expression der Markergene IL-6, IL-8, CASP3 und VEGFA

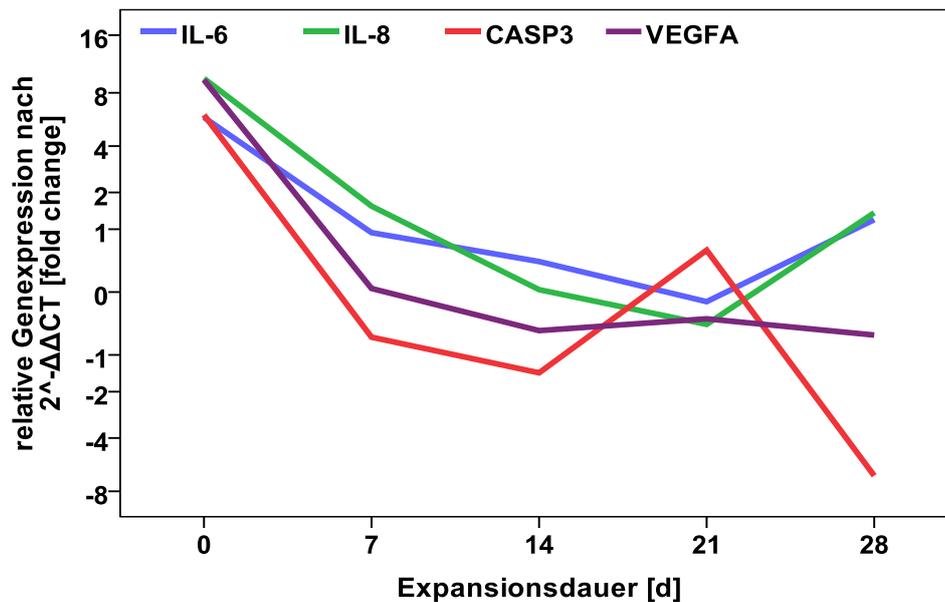


Abbildung 57: Zeitlicher Verlauf der relativen Expression der Entzündungsmarker Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8) sowie des Apoptosemarkers Caspase 3 (CASP3) und des Angiogenesemarkers „vascular endothelial growth factor A“ (VEGFA) in VSOP-markierten Fettgewebstammzellen in einem 4-wöchigen Zeitraum nach der Markierung mit 1,5 mM VSOP. Die Genexpression in unmarkierten und markierten ASC wurde auf die des Haushaltsgens GAPDH normiert. Anschließend wurde die Markergenexpression markierter Zellen auf die von unmarkierten Zellen bezogen. Der Verlauf der Genexpression in VSOP-markierten Zellen zeigte bei allen Genen im Vergleich zu unmarkierten Zellen keine signifikante Veränderung im Zeitverlauf (n = 6).

3.6 Detektion von Fettgewebstammzellen nach der Markierung mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln

3.6.1 Berlinerblau-Färbung

Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel konnten im Zytoplasma von Fettgewebstammzellen, welche mit 1,5 mM VSOP markiert wurden, nach der Berlinerblau-Färbung als blaue Körnchen ausgemacht werden (siehe Abbildung 58 A). Ebenso konnten VSOP-markierte ASC in hochdichten Zellkugeln nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung mit derselben Färbemethode nachgewiesen werden (siehe Abbildung 58 B). Somit war es mit der Berlinerblau-Färbung möglich, markierte ASC in zwei- und dreidimensionalen Kulturen unmittelbar nach bzw. 21 Tage nach der Markierung mit VSOP nachzuweisen.

Im Langzeitversuch über 4 Wochen zeigten sich nach der Berlinerblau-Färbung mit zunehmender Expansionsdauer und Passagenzahl immer weniger markierte Zellen je Bildausschnitt (siehe Abbildung 59 A-E). Unmittelbar nach der Markierung konnten in

vielen Zellen im Zellrasen intrazelluläre Eisenoxidnanopartikel ausgemacht werden. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes nach 28 Tagen war dies nur noch vereinzelt zu beobachten. Ebenso war unmittelbar nach der Markierung zu beobachten, dass die Aufnahme der Partikel durch die Zellen im Zellrasen sehr inhomogen war. Während manche Zellen eine großflächige Blaufärbung im Zytoplasma aufwiesen, war dies in anderen Zellen nicht der Fall.

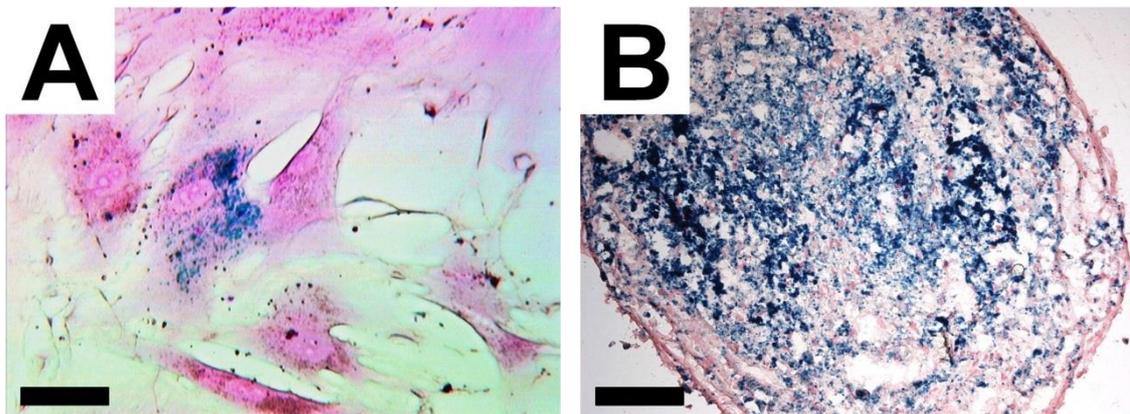


Abbildung 58: Mit 1,5 mM VSOP markierte Fettgewebsstammzellen nach der Berlinerblau-Färbung in unterschiedlichen Kulturen. A: ASC mit intrazellulären, blau angefärbten Eisenoxidnanopartikeln (Balken = 50 μ m). B: markierte ASC in einem hochdichten Zellkugeln nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung (Balken = 200 μ m). Mit der Berlinerblau-Färbung konnten markierte Zellen und somit intrazelluläres Eisen in zwei- und dreidimensionalen Kulturen nachgewiesen werden.

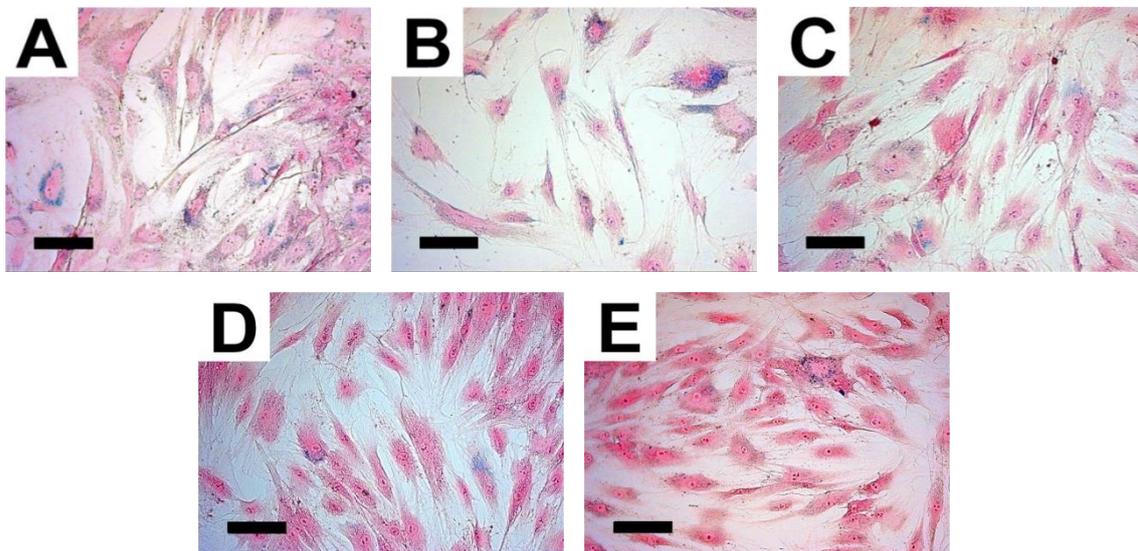


Abbildung 59: Mit 1,5 mM VSOP markierte Fettgewebsstammzellen nach der Berlinerblau-Färbung innerhalb eines 28-tägigen Kultivierungszeitraums in Expansionsmedium unter Passagierung in 7-tägigen Abständen (Balken je 100 μ m). A: Zellen unmittelbar nach der Markierung. B: Zellen am Tag 7. C: Zellen am Tag 14. D: Zellen am Tag 21. E: Zellen am Tag 28. Mit zunehmender Expansionsdauer und Passagenzahl waren je Bildausschnitt immer weniger markierte Zellen im Zellrasen auszumachen. Ebenso zeigte sich unmittelbar nach Versuchsbeginn eine relativ inhomogene Aufnahme der Partikel durch die Zellen.

3.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) war es möglich, in Fettgewebstammzellen VSOP-Ansammlungen als dunkelgraue bis schwarze Färbungen in intrazellulären Vesikeln auszumachen (siehe Abbildung 60). Diese waren in unmarkierten Zellen nicht nachweisbar. Ähnlich wie bei der Berlinerblau-Färbung zeigte sich auch hier bei den markierten Zellen eine unterschiedliche Aufnahme der Partikel in das Zytoplasma. Die Anwesenheit der Nanopartikel in den Zellkernen markierter Zellen konnte nicht gezeigt werden.

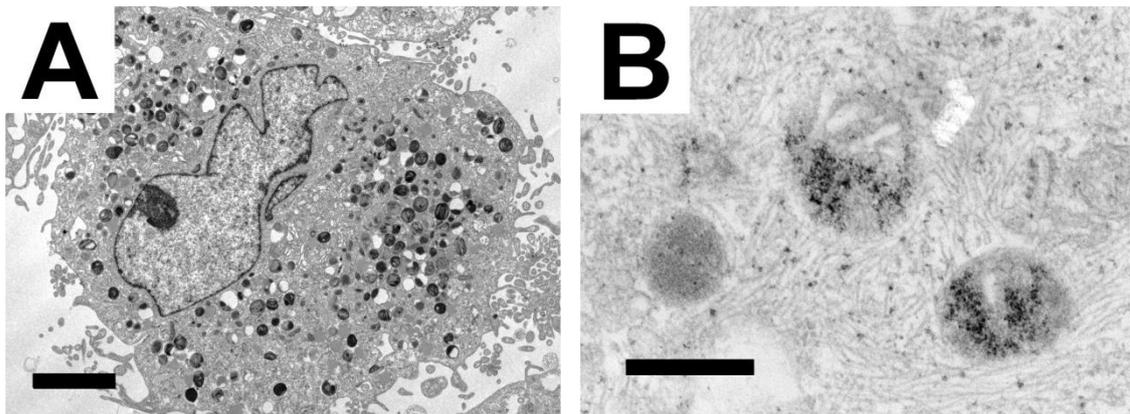


Abbildung 60: TEM-Aufnahmen markierter Fettgewebstammzellen mit dunkelgrau bis schwarz gefärbten, VSOP-beinhaltenen intrazellulären Vesikeln. A: VSOP-markierte Fettgewebstammzelle mit Zellkern und intrazellulären Vesikeln (Balken = 2,5 µm). B: intrazelluläre Vesikel mit Ansammlungen von VSOP (Balken = 0,4 µm). Die Aufnahme von VSOP in das Zytoplasma war von Zelle zu Zelle unterschiedlich.

3.6.3 Magnetresonanztomographie

3.6.3.1 Markierte Zellen in Agarosegelen

Mit 0,15 mM bis 1,5 mM VSOP markierte Fettgewebstammzellen in 1,5%igen Agarosegelen konnten im 11,7 Tesla Hochfeld-MRT-Gerät durch Färbungen in unterschiedlichen, VSOP-konzentrationsabhängigen Grautönen nachgewiesen werden. Die Intensität der Graufärbung nahm mit sinkender VSOP-Konzentration ab (siehe Abbildung 61 A und B). Somit erschienen Gele mit Zellen der VSOP-Konzentration 1,5 mM dunkelgrau während sich Gele mit Zellen der VSOP-Konzentration 0,15 mM farblich von Gelen mit unmarkierten Zellen (siehe Abbildung 61 C) kaum unterschieden. Bis zu einer VSOP-Konzentration von 0,3 mM konnten markierte von unmarkierten Zellen in Agarosegelen farblich differenziert werden.

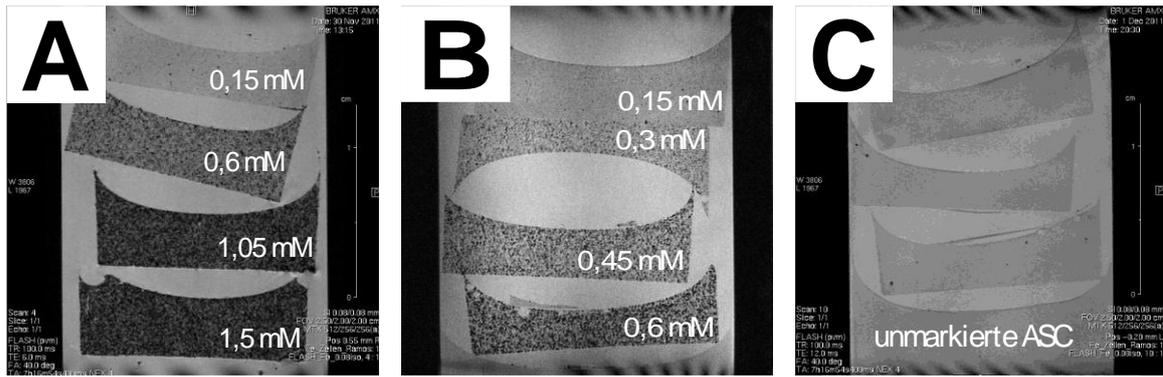


Abbildung 61: MRT-Aufnahmen bei 11,7 Tesla von 1,5%igen Agarosegelen mit unmarkierten und VSOP-markierten Fettgewebstammzellen. A: 0,15 mM bis 1,5 mM VSOP. B: 0,15 mM bis 0,6 mM VSOP. C: unmarkierte Zellen (alle Gele). Die Nachweisbarkeit von markierten Zellen in Agarosegelen nahm mit sinkender VSOP-Konzentration ab. Markierte Zellen in Agarosegelen waren nur bis zu einer VSOP-Konzentration von 0,3 mM noch nachweisbar und von Gelen mit unmarkierten Zellen zu unterscheiden.

3.6.3.2 Markierte Zellen in Kaninchenstimmlippen

Markierte Fettgewebstammzellen der VSOP-Konzentration 1,5 mM wurden in die jeweils rechte Stimmlippe von Kaninchen injiziert. 6 und 12 Wochen nach der Injektion wurden die Kehlköpfe der euthanasierten Tiere im 11,7 Tesla Hochfeld-MRT-Gerät dargestellt (siehe Abbildung 62 A und B). Nach 6 Wochen wurden vereinzelt VSOP-markierte ASC in den rechten Stimmlippen der explantierten Kaninchenkehlköpfe im Injektionsareal nachgewiesen (siehe Abbildung 62 A), während dies nach 12 Wochen nicht der Fall war (siehe Abbildung 62 B). Des Weiteren zeigte sich im Hochfeld-MRT-Gerät eine unterschiedliche Auflösung anatomisch relevanter Strukturen der Kehlköpfe sowie ein inhomogener Gewebekontrast.

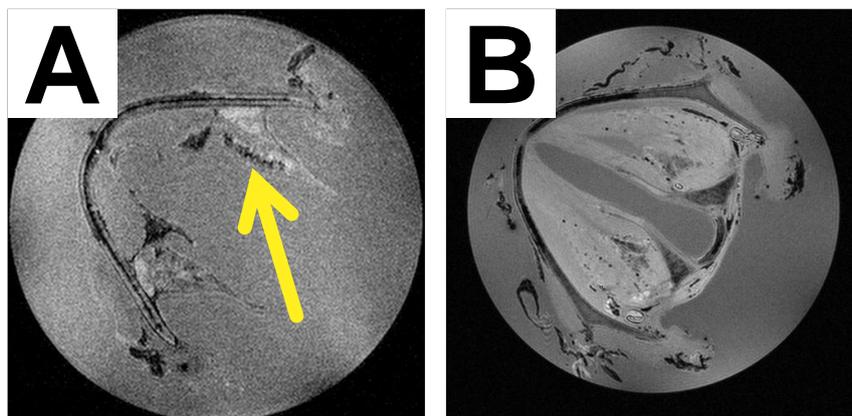


Abbildung 62: Vergleich von MRT-Aufnahmen bei 11,7 Tesla von Kaninchenkehlköpfen mit Stimmlippen, in die mit 1,5 mM VSOP-markierte Fettgewebstammzellen injiziert wurden. A: markierte ASC in der rechten Kaninchenstimmlippe im Injektionsareal (siehe gelber Pfeil) 6 Wochen nach der Injektion. B: Kaninchen-Kehlkopf mit Stimmlippen ohne Nachweis der markierten ASC im Injektionsareal 12 Wochen nach der Injektion.

Die Kaninchenkehlköpfe und Stimmlippen, in denen mittels MRT keine markierten Zellen nachgewiesen werden konnten, wurden nachfolgend mit der Berlinerblau-Färbung histologisch untersucht. Hier zeigte eine Blaufärbung die Anwesenheit weniger injizierter und markierter Zellen im Stimmlippenbereich in den die Injektion der markierten Zellen zuvor erfolgte (siehe Abbildung 63 A und B).

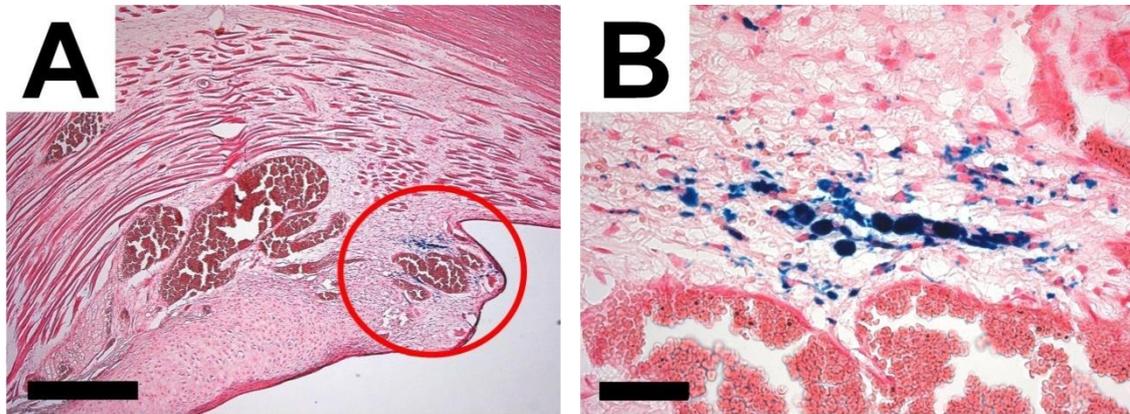


Abbildung 63: Histologische Untersuchung einer Kaninchenstimmlippe im Injektionsareal von VSOP-markierten Fettgewebstammzellen mit der Berlinerblau-Färbung. A: rechte Stimmlippe mit markierten Zellen im rot eingekreisten Areal (Balken = 500 μm). B: markierte Zellen im rot eingekreisten Areal vergrößert (Balken = 50 μm). Markierte ASC konnten mit der Berlinerblau-Färbung in der rechten Kaninchenstimmlippe 12 Wochen nach der Injektion nachgewiesen werden.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe zu isolieren. Diese Zellen zeigten eine Bindungseigenschaft an Plastik, exprimierten stammzellspezifische Oberflächenmarkerproteine und konnten erfolgreich zu phänotypähnlichen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen differenziert werden. Fettgewebstammzellen wurden in Hydrogelkonstrukten aus Kombinationen von Kollagen Typ I, Hyaluronsäure, Fibrin und Agarose durch die Zugabe unterschiedlicher Wachstumsfaktorkombinationen innerhalb von 14 Tagen zu matrixproduzierenden phänotypähnlichen Knorpelzellen differenziert. In der extrazellulären Matrix dieser differenzierten Zellen wurde die Anwesenheit knorpelspezifischer Matrixproteine wie Kollagene, Aggrecan und Glykosaminoglykane histologisch und biochemisch nachgewiesen. Ebenso konnte in diesen Zellen die Expression knorpelspezifischer Markergene molekularbiologisch gezeigt werden. Die Kombination von Wachstumsfaktoren zur chondrogenen Differenzierung von Fettgewebstammzellen führte nicht zu einer Zunahme der extrazellulären Matrixanreicherung und knorpelspezifischen Genexpression. Eine knorpelähnliche Morphologie, die stärkste extrazelluläre Matrixsekretion und höchste knorpelspezifische Genexpression war überwiegend in agarosefreien Hydrogelkonstrukten in Anwesenheit von Kollagen Typ I

und Hyaluronsäure zu beobachten. In einem *in vitro*-Knorpeldefektmodell zeigte sich 14 Tage und 6 Wochen nach der Implantation vor- bzw. nicht-vordifferenzierter Zell-Hydrogelkonstrukte in künstlich generierte Schweineohrknorpeldefekte makroskopisch und histologisch keine Defektdeckung oder Integration der Implantate in den Nativknorpel. 3 und 6 Wochen nach der Implantation vordifferenzierter Zell-Hydrogelkonstrukte in künstlich generierte Kaninchenohrknorpeldefekte zeigte sich in einem *in vivo*-Knorpeldefektmodell histologisch nur sehr vereinzelt eine beginnende Defektdeckung und Integration der Implantate. Diese wurden größtenteils resorbiert oder in Bindegewebe umgebaut.

Die Markierung von Fettgewebstammzellen mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln (VSOP) in unterschiedlichen Konzentrationen hatte keine zytotoxischen Einflüsse auf ASC, während die höchste verwendete VSOP-Konzentration genotoxisch war. Histologisch und mittels Transmissionselektronenmikroskopie konnten intrazelluläre VSOP im Zytoplasma markierter Zellen nachgewiesen werden. Markierte Zellen unterschiedlicher VSOP-Konzentrationen in Agarosegelen zeigten mittels Magnetresonanztomographie (MRT) eine Nachweisgrenze von etwa 0,3 mM VSOP. In Kaninchenstimmlippen waren markierte Zellen 6 nach der Injektion mittels MRT bei 11,7 Tesla vereinzelt nachweisbar, während VSOP-markierte ASC 12 Wochen danach nur noch histologisch ausgemacht werden konnten.

4 DISKUSSION

4.1 Sind Fettgewebstammzellen für den therapeutischen Einsatz in der regenerativen Medizin geeignet?

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fettgewebstammzellen zeigten eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie, die Bindungseigenschaft an Plastik und die Expression der spezifischen Oberflächenmarkerproteine CD44, CD73, CD90 und CD105. Die Oberflächenmarkerproteine CD34 und CD45 wurden nicht exprimiert. Des Weiteren konnten diese Zellen zu phänotypähnlichen Fett-, Knochen- und Knorpelzellen differenziert werden. Dies konnte durch die Anwesenheit intrazellulärer Lipidvakuolen, die extrazelluläre Anreicherung von Calcium und Knorpelmatrixproteinen sowie die Expression gewebespezifischer Markergene entsprechend nachgewiesen werden.

Die Bindungseigenschaft an Plastik (siehe Abbildung 17), Expression spezifischer Oberflächenmarkerproteine (siehe Abbildung 18) und das Multidifferenzierungspotential (siehe Abbildung 19) der aus humanem Fettgewebe isolierten Stammzellen der vorliegenden Arbeit deckt sich mit den drei Minimalkriterien der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (International Society for Cellular Therapy, ISCT) für mesenchymale Stammzellen (Dominici et al., 2006). Auch von anderen Arbeitsgruppen wurden diese Bindungseigenschaft an Plastik (Mitchell et al., 2006; Ikegame et al., 2011; Gehmert et al., 2011), das Expressionsmuster der spezifischen Oberflächenmarkerproteine (Dicker et al., 2005; Kern et al., 2006; Mitchell et al., 2006) und das Multidifferenzierungspotential (Wakitani et al., 1995; Johnstone et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Guilak et al., 2010) von Fettgewebstammzellen gezeigt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen nach diesen drei Minimalkriterien charakterisiert. Nach Versuchsabschluss wurden von der ISCT Kriterien zur Definition und Leitlinien für die Charakterisierung von Fettgewebstammzellen publiziert (Bourin et al., 2013). Deren nachträgliche Übertragung auf die hier verwendeten mesenchymalen Stammzellen zeigt, dass diese plastikadhärenten Zellen mit ihrer typischen spindelförmigen und fibroblastenartigen Morphologie (siehe Abbildung 17) Fettgewebstammzellen sind. Ebenso entspricht der hier angewendete Nachweis des Multidifferenzierungspotentials durch die Expression gewebespezifischer Markergene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (siehe Abbildung 20) den neuen Leitlinien. Analog gilt dies für die Expression spezifischer Oberflächenmarkerproteine (siehe Abbildung 18) mittels Durchflusszytometrie (Bourin et

al., 2013). Die Expression der ergänzten Oberflächenmarkerproteine kann jedoch nicht beurteilt werden, da diese nicht untersucht wurde.

Mittlerweile werden Fettgewebstammzellen nicht nur in der Forschung sondern auch im Rahmen klinischer Anwendungen eingesetzt (Yoshimura et al., 2008, 2010; Garcia-Olmo et al., 2009; Gimble et al., 2010; Casteilla et al., 2011; Gir et al., 2012; Sung et al., 2012). Auch in der Datenbank des nationalen US-Gesundheitsinstituts (National Institutes of Health, NIH; <http://clinicaltrials.gov>) sind Therapieansätze und klinische Anwendungsgebiete zu finden. Neben der Erfüllung der Minimalkriterien der ISCT für mesenchymale Stammzellen (Dominici et al., 2006) und Fettgewebstammzellen (Bourin et al., 2013) sind weitere Eigenschaften von Fettgewebstammzellen für deren Verwendung in der regenerativen Medizin ausschlaggebend. Dafür sprechen deren wundheilungsfördernde Wirkung (Lee et al., 2006; Hong et al., 2011b; Liang et al., 2012) und Stimulierung der Geweberegeneration (Gimble et al., 2007). In Bezug auf die Laryngologie führte dies bereits zu Untersuchungen des Einflusses mesenchymaler Stammzellen auf die Stimmlippenvernarbung (Kutty & Webb, 2009; Kumai et al., 2009; Long et al., 2010) und Stimmlippenregeneration (Xu et al., 2011). Ebenso wurden zellbesiedelte Hydrogel-Modelle mit dem Ziel ihrer Anwendung zur Stimmlippen-augmentation analysiert (Park et al., 2010). Aufgrund ihres Multidifferenzierungspotentials haben Fettgewebstammzellen außerdem die Fähigkeit zu phänotypähnlichen Knorpelzellen zu differenzieren und knorpelgewebespezifische Moleküle zu produzieren (Erickson et al., 2002; Wickham et al., 2003; Awad et al., 2004; Estes et al., 2006). Dies konnte in vorliegender Arbeit ebenfalls gezeigt werden (siehe Abbildungen 19 D-F, 20, 22-25, 27-31, 33, 35 und 37) und ist für die Generierung von Knorpelersatzgewebe eine wichtige Basis. Die immunologischen Charakteristika von Fettgewebstammzellen sprechen einerseits für und andererseits gegen deren Gebrauch in der regenerativen Medizin. Mehreren Studien nach haben diese Zellen eine geringe Immunogenität und immunmodulatorische sowie immunsuppressive Eigenschaften (Puissant et al., 2005; Kang et al., 2008). Daraus resultieren die Fragen, ob und wie sich diese Eigenschaften nach der Zell-Transplantation oder -Differenzierung verändern und was dies für eine autologe und allogene Verwendung zur Folge hätte. In unserer Arbeitsgruppe wurden immunsuppressive und immunogene Marker nach der chondrogenen Differenzierung von Fettgewebstammzellen nachgewiesen (Technau et al., 2011). Dies bedeutet, dass diese Zellen immunsuppressive und immunogene Eigenschaften besitzen bzw. während der Differenzierung entwickeln. Durch immunogene Eigenschaften lassen sich Immunreaktionen nach allogener Transplantation dieser Zellen nicht ausschließen. Daher beschränkt die Anwesenheit solcher immunogener Marker den Gebrauch von

Fettgewebstammzellen auf autologe Anwendungen (McIntosh et al., 2006). Auch eine mögliche maligne Transformation und eine Beteiligung von Fettgewebstammzellen an der Tumorentstehung sind zu berücksichtigende Faktoren für die Verwendung dieser Zellen in der regenerativen Medizin. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein signifikanter, kontinuierlicher Anstieg von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen in Fettgewebstammzellen mit steigender Passagenzahl bei der *in vitro*-Expansion beobachtet (Froelich et al., 2013). Ob und inwieweit dies zu einer malignen Transformation führt, ist noch unklar und Bestandteil weiterer Untersuchungen. Daraus kann jedoch geschlossen werden, dass für eine humane Anwendung eine *in vitro*-Expansion von Fettgewebstammzellen mit Passagierung möglichst zu vermeiden ist. Bezüglich der Interaktion von Fettgewebstammzellen mit Tumoren wird in der Literatur sowohl von einer Hemmung (Zhang et al., 2009; Prantl et al., 2010; Zimmerlin et al., 2011) als auch von einer Förderung (Cousin et al., 2009; Seo et al., 2011) der Tumorzellproliferation berichtet. Letztere Eigenschaft wird von den Autoren mit der parakrinen Sekretion zahlreicher Wachstumsfaktoren dieser Zellen in Verbindung gebracht. Dies ist z. B. für die Verwendung dieser Zellen in der Laryngologie relevant, da rekonstruktive Eingriffe am Larynx auch bei Tumorpatienten notwendig sind. Es stellt sich die Frage, ob die Interaktion zwischen Fettgewebstammzellen und Tumoren der Kopf-Hals-Region zu einer spontanen malignen Transformation dieser Zellen führt. Die Wahrscheinlichkeit einer Initiierung oder Reaktivierung von Tumoren durch Fettgewebstammzellen in ehemaligen Tumorgebieten ist hierfür zu evaluieren.

Auch wenn diese Zellen aufgrund ihrer positiven Eigenschaften in der regenerativen Medizin bereits verwendet werden, so sind die Ursachen und Physiologie deren negativen Eigenschaften tiefgründig zu untersuchen und zu entschlüsseln. Erst der vollständige Ausschluss möglicher Risikofaktoren für den Menschen gibt der Verwendung von Fettgewebstammzellen in der regenerativen Medizin einen unbedenklichen Charakter.

4.2 Agarosehaltige Hydrogele weisen bezüglich ihrer Materialeigenschaften und der Zellverteilung als Trägermaterialien für Knorpelersatzgewebe überwiegend Nachteile auf

In vorliegender Arbeit wurden Hydrogelkombinationen aus Kollagen Typ I, Agarose, Fibrin und Hyaluronsäure als Trägermaterialien für Fettgewebstammzellen und zur Herstellung von Knorpelersatzgewebe untersucht. Agarosehaltige Gele haben sich schnell verfestigt, wiesen eine mangelnde Durchmischung der Gelkomponenten auf und waren zwar formstabil aber auch brüchig. Agarosefreie Gele wiesen im Gegensatz dazu eine

langsamere Verfestigung, eine bessere Durchmischung von Gelkomponenten und eine gute Flexibilität auf. Während der Kultivierung behielten agarosehaltige Gele ihre Formstabilität, während agarosefreie Gele schrumpften. Letztere Eigenschaft war bei Gelen aus Kollagen Typ I und Hyaluronsäure am deutlichsten ausgeprägt. Die nachfolgende histologische Untersuchung zeigte eine inhomogene Zellverteilung in agarosehaltigen Gelen, welche in agarosefreien Gelen überwiegend homogen war.

Ein ideales Trägermaterial ist eine biokompatible, biomimetische Matrix, welche die Zellbindung ermöglicht, die Proliferation und Differenzierung der Zellen fördert, die Anreicherung von extrazellulären Matrixproteinen begünstigt und allmählich abgebaut wird (Kwon & Buckmire, 2004). Kollagen Typ I, Hyaluronsäure und Fibrin sind endogene Substanzen, von denen die ersten beiden Bestandteil der Knorpelmatrix sind (Balakrishnan & Banerjee, 2011) und alle eine hohe Biokompatibilität aufweisen (Lee & Mooney, 2001; Solchaga et al., 2005; Raghunath et al., 2007). Agarose hingegen ist ein allogener Stoff, welcher aus asiatischen Meeralgen gewonnen wird (Zhou et al., 2006) und ebenfalls biokompatibel ist (Zhang et al., 2012). Endogene Substanzen werden *in vivo* schneller abgebaut (Zheng et al., 2009; Balakrishnan & Banerjee, 2011; Burdick & Prestwich, 2011) als Agarose (Stokols et al., 2006; Gros et al., 2010), was auch in vorliegender Arbeit beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 41). Mesenchymale Stammzellen können aufgrund spezifischer Integrinrezeptoren an die o. g. endogenen Substanzen binden (Lee & Mooney, 2001; Gao et al., 2001; Solchaga et al., 2005; Raghunath et al., 2007). Agarose hingegen ist bioinert (Stokols et al., 2006; Raghunath et al., 2007) und bietet diesen Zellen keine Bindungsmöglichkeiten (Awad et al., 2004; Batorsky et al., 2005; Zhang et al., 2012). Wird dies auf die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit übertragen, so folgt daraus, dass die fehlende Bindung von Fettgewebstammzellen an Agarose für die inhomogene Zellverteilung in agarosehaltigen Gelen (siehe Abbildungen 22 und 23) mit verantwortlich sein könnte. Eine inhomogene Zellverteilung ist für die Generierung von Knorpelersatzmaterialien nachteilig, da aus einer homogenen Zellverteilung in Trägermaterialien auch eher eine homogene extrazelluläre Knorpelmatrix hervorgeht (Awad et al., 2004; Lee et al., 2005; Woodfield et al., 2004; Balakrishnan & Banerjee, 2011). Agarosegelen können durch Zugabe von Aminosäuresequenzen aus den drei L-Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure (RGD-Sequenzen) Bindungsmöglichkeiten für mesenchymale Stammzellen verliehen werden (Alsberg et al., 2002; Balakrishnan & Banerjee, 2011). Auch durch eine Quervernetzung mit allogener Substanzen ist dies möglich, wie von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (Batorsky et al., 2005; Alaminos et al., 2006; Rao et al., 2012; San Martin et al., 2013). Nun stellt sich die Frage, warum in vorliegender Arbeit die

Quervernetzung von Agarose mit allogenen Substanzen nicht zu einer homogenen Zellverteilung in agarosehaltigen Gelen geführt hat. Eine Erklärung hierfür wäre die hier beobachtete mangelnde Durchmischung dieser Gele (siehe Abbildung 21) aufgrund der schnellen Verfestigung von Agarose. Außerdem kann Agarose keine Proteine der extrazellulären Knorpelmatrix adsorbieren (Fedorovich et al., 2007), was für eine homogene Durchmischung von Agarose und Kollagen ebenfalls nachteilig sein könnte.

Ein weiterer Nachteil von Agarosegelen ist deren geringe mechanische Festigkeit (Fedorovich et al., 2007; Balakrishnan & Banerjee, 2011). So kann eine mechanische Belastung bei der Verarbeitung zu dauerhaften Rissen oder Brüchen in den Gelen führen (Dorvee et al., 2012), was in vorliegender Arbeit ähnlich beobachtet wurde (siehe Abbildung 7). Ein Vorteil von Agarosegelen ist deren Volumenstabilität (siehe Abbildungen 7, 21 und 40), während andere Arbeitsgruppen die Schrumpfung von Kollagen- (Zhu et al., 2001; Engler et al., 2006; Badillo et al., 2007; Eyrich et al., 2007b; Natesan et al., 2010), Hyaluronsäure- (Erickson et al., 2009; Kim et al., 2011; Toh et al., 2012) und Fibringelen (Alaminos et al., 2006; Eyrich et al., 2007a; Steward et al., 2012) mehrfach beschrieben haben. Dies deckt sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildungen 21 und 40), wofür es in der Literatur eine mögliche Erklärung gibt: So wurde gezeigt, dass Fibroblasten und Chondrozyten das Gen für Glattmuskelaktin (Smooth Muscle Actin, SMA) exprimieren, wodurch ein kontraktiles Verhalten dieser Zellen zu vermuten ist (Lee & Loeser, 1999; Spector, 2001). Badillo et al. (2007) zeigten dieses Verhalten für mesenchymale Stammzellen und Fibroblasten in Kollagengelen. Dieses kontraktile Verhalten erlaubt diesen Zellen, Moleküle der extrazellulären Matrix bei der Architekturverleihung eines Gewebes zu modellieren (Lee & Loeser, 1999; Spector, 2001) und ist z. B. bei der zellulären Kondensation während der chondrogenen Differenzierung zu beobachten (Balakrishnan & Banerjee, 2011; Hamid et al., 2012; Toh et al., 2012). In vorliegender Arbeit könnte auch Hyaluronsäure die Gelschrumpfung beeinflusst haben, ähnlich wie dies bei der Narbenkontraktion der Fall ist (Tan & Marra, 2010). Hier war die Schrumpfung hyaluronsäurehaltiger Gele ohne Agarose am stärksten (siehe Abbildungen 21 und 40) und entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Hahn et al., 2006; Tang & Spector; 2007). Auch wenn Agarose schlechte mechanische Eigenschaften aufweist (Fedorovich et al., 2007; Balakrishnan & Banerjee, 2011; Dorvee et al., 2012), so kann sie die Schrumpfung anderer Trägermaterialien minimieren oder verhindern (siehe Abbildungen 21 und 40), wie dies auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Ulrich et al., 2010; Lake et al., 2011; Lake & Barocas 2011). Dies ist für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe besonders wichtig, da zukünftige klinische

Anwendungen volumen- und formstabile Trägermaterialien erfordern (Hunziker et al., 2002).

4.3 Führt die Kombination von Wachstumsfaktoren zu einer Verstärkung der chondrogenen Differenzierung von Fettgewebstammzellen?

In vorliegender Arbeit wurden Fettgewebstammzellen in Hydrogelkombinationen eingebettet und mit den Wachstumsfaktoren TGF- β 3, TGF- β 3 plus BMP-6 und TGF- β 3 plus IGF-I über 14 Tage zu phänotypähnlichen Knorpelzellen differenziert. Der anschließende histologische und immunhistochemische Nachweis der Differenzierung zeigte eine Anreicherung von Glykosaminoglykanen und Kollagen in den Gelen bzw. die Expression von SOX9 in den Zellen. Analog hierzu wies die biochemische Untersuchung die Anreicherung von Kollagen und Glykosaminoglykanen nach. Die molekularbiologische Analyse ließ die Expression der knorpelspezifischen Markergene Aggrekan, „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP), „cartilage acidic protein“ (CRTAC), Kollagen Typ I, Kollagen Typ II, Kollagen Typ X und SOX9 in Fettgewebstammzellen nach der Differenzierung mit TGF- β 3 alleine sowie in Kombination mit BMP-6 und IGF-I erkennen.

Die Basis für die Herstellung von Knorpelersatzgewebe mittels Tissue Engineering ist die Differenzierung von Stammzellen zu matrixproduzierenden, phänotypähnlichen Knorpelzellen in einem geeigneten Trägermaterial. Die wichtigste Rolle übernehmen dabei chondrogene Wachstumsfaktoren wie TGF- β 3 und BMP-6 (Estes et al., 2006; Hennig et al., 2007) sowie IGF-I (Kim & Im, 2009) und Dexamethason (Indrawattana et al., 2004; Kim & Im, 2009). Auch die Zelldichte (Kavalkovich et al., 2002; Hui et al., 2008) und Induktionsdauer (Zuk et al., 2002; Liao et al., 2007; Chang et al., 2008) beeinflussen die chondrogene Differenzierung. Die in vorliegender Arbeit gezeigte knorpelspezifische Matrixanreicherung (siehe Abbildungen 22-25, 27 und 28) wurde auch von anderen Arbeitsgruppen ähnlich beobachtet (Sekiya et al., 2001; Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006; Bernardo et al., 2007; Hennig et al., 2007; Weiss et al., 2010). Bei diesen führte jedoch die Kombination von TGF- β 3 mit BMP-6 oder IGF-I größtenteils zu einer Verstärkung der Anreicherung von Knorpelmatrixproteinen wie Glykosaminoglykane und Kollagen Typ II, während dies in vorliegender Arbeit nicht beobachtet wurde (siehe Abbildungen 22-25, 27 und 28). Da diese Proteine ein wichtiger Bestandteil der hyalinen Knorpelmatrix sind (Awad et al., 2003; Schagemann et al., 2006; Kim & Im, 2009; Strehin & Elisseeff, 2009; Puetzer et al., 2010), stellt deren Anreicherung während der chondrogenen Differenzierung einen wichtigen Schritt dar (Akiyama et al., 2002; Awad et al., 2003; Guilak et al., 2004; Bunnell et al., 2008; Kim & Im, 2009; Vater et al., 2011).

Analog zu den Beobachtungen der Knorpelmatrixsekretion führte auch die Kombination von Wachstumsfaktoren bei anderen Arbeitsgruppen überwiegend zu einer höheren knorpelspezifischen Markergenexpression (Sekiya et al., 2001; Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006; Bernardo et al., 2007; Hennig et al., 2007; Weiss et al., 2010). In vorliegender Arbeit konnte jedoch das Vorhandensein eines verstärkenden Einflusses der Wachstumsfaktorkombinationen auf die Markergenexpression im Vergleich zu TGF- β 3 alleine nicht beurteilt werden (siehe Abbildungen 29-35). Das Markergen SOX9 ist ein früher Transkriptionsfaktor der chondrogenen Differenzierung (Akiyama et al., 2002) und reguliert die Expression der Markergene Aggrekan, Kollagen Typ II und Kollagen Typ X (Zhang et al., 2003; Kelly & Jacobs, 2010). Neben der in vorliegender Arbeit gezeigten Expression von Aggrekan, COMP, CRTAC und SOX9 (siehe Abbildungen 29-31 und 35) gab vor allem die Expression der unterschiedlichen Kollagengene Aufschluss über den Phänotyp der knorpelähnlichen Zellen und der gebildeten Knorpelmatrix. Kollagen Typ II ist charakteristisch für hyalinen Knorpel (Schagemann et al., 2006; Strehin & Elisseeff, 2009; Puetzer et al., 2010), aus dem auch das Kehlkopfskelett größtenteils besteht. Die Expression von Kollagen Typ II wurde in vorliegender Arbeit (siehe Abbildung 33) ebenso wie von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen (Sekiya et al., 2001; Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006; Bernardo et al., 2007; Hennig et al., 2007; Weiss et al., 2010), was auf die Bildung einer hyalinähnlichen Knorpelmatrix hindeutete. Einige dieser Gruppen zeigten neben der Expression von Kollagen Typ II auch die Expression der Markergene Kollagen Typ I (Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006; Bernardo et al., 2007) und Kollagen Typ X (Sekiya et al., 2001; Bernardo et al., 2007; Hennig et al., 2007; Weiss et al., 2010). Diese Gene signalisieren die Bildung einer faserknorpelähnlichen Matrix (Strehin & Elisseeff, 2009) bzw. die Anwesenheit hypertropher Knorpelzellen (Shen et al., 2005). Somit haben diese Knorpelersatzgewebe vermutlich sowohl hyaline als auch faserige und/oder hypertrophe Charakteristika. In vorliegender Arbeit wurden Kollagen Typ I (siehe Abbildung 32) sowie Typ II und Typ X (siehe Abbildungen 33 und 34) in differenzierten Zellen stärker bzw. weniger exprimiert als in nativen Knorpelzellen. Daher ist die Entstehung eines faserknorpelähnlichen Knorpelgewebes zu vermuten. Durch die zusätzliche Expression von Aggrekan, COMP, CRTAC und SOX9 (siehe Abbildungen 29-31 und 35) ist jedoch die Bildung eines Knorpelgewebes mit faserigen und hyalinen Eigenschaften wahrscheinlicher.

In Bezug auf die vorliegende Arbeit stellt sich die Frage, unter welchen Bedingungen die Kombination von Wachstumsfaktoren bei anderen Arbeitsgruppen zu einer Verstärkung der knorpelspezifischen Matrixsekretion und Markergenexpression führte. Während diese TGF- β 3 in derselben Konzentration wie in vorliegender Arbeit verwendeten, wurde von

diesen IGF-I niedriger dosiert (Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006; Weiss et al., 2010) und BMP-6 in einer 50-fach höheren Konzentration eingesetzt (Sekiya et al., 2001; Indrawattana et al., 2004; Bernardo et al., 2007). Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde eine stärkere chondrogene Differenzierung von Fettgewebstammzellen in Polyurethan-Fibrin-Konstrukten bei einer BMP-6-Konzentration von 500 ng/ml gezeigt. Die Erhöhung der Konzentration bestimmter Wachstumsfaktoren kann somit die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen verstärken (Kim & Im, 2009). Bei den anderen Arbeitsgruppen war auch die Induktionsdauer der Chondrogenese länger als die in vorliegender Arbeit. So induzierten Sekiya et al. (2001), Indrawattana et al. (2004) und Bernardo et al. (2007) über 21 Tage, während Hennig et al. (2007) und Weiss et al. (2010) bis 42 Tage induzierten. Ein Einfluss der Induktionsdauer auf die chondrogene Differenzierung wird in der Literatur mehrfach beschrieben (Zuk et al., 2002; Liao et al., 2007; Chang et al., 2008). Ebenso unterscheidet sich von der vorliegenden Arbeit, dass die anderen Arbeitsgruppen hochdichte Zellkugeln (Sekiya et al., 2001; Indrawattana et al., 2004; Bernardo et al., 2007; Weiss et al., 2010) und Sphäroide (Hennig et al., 2007) herstellten anstatt die Zellen in Hydrogelen einzubetten. Somit war die Zelldichte in diesen dreidimensionalen Kulturen weit höher als die in den hier verwendeten Hydrogelen, welche 1 Mio Zellen/ml betrug. Die dabei vermehrt auftretenden Zell-Zell-Kontakte wirken sich ebenfalls positiv auf die chondrogene Differenzierung aus (Kavalkovich et al., 2002; Tuli et al., 2003; Park et al., 2007; Hui et al., 2008).

Aufgrund der bereits erläuterten unterschiedlichen Wachstumsfaktorkonzentrationen, Induktionszeiten und Zelldichten war ein Vergleich der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen auf die der vorliegenden Arbeit nur bedingt möglich. Diese haben gezeigt, dass die Kombination von chondrogenen Wachstumsfaktoren in höheren Konzentrationen zusammen mit längeren Induktionszeiten und höheren Zelldichten zu einer Verstärkung der chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen führen kann. Für die vorliegende Arbeit lässt sich daraus schließen, dass die hier verwendeten Wachstumsfaktorkonzentrationen und Zelldichte sowie die Induktion der Chondrogenese über 14 Tage möglicherweise zu niedrig bzw. zu kurz waren, um annähernd eine für hyalinen Knorpel typische Matrixanreicherung und Markergenexpression zu erzielen.

4.4 Die extrazelluläre Matrixsekretion und knorpelspezifische Genexpression wird auch von den Trägermaterialien beeinflusst

Dieses Kapitel bezieht sich wie auch das Vorherige auf die chondrogene Differenzierung der in Hydrogelkombinationen eingebetteten Fettgewebstammzellen. Hier wurde die knorpelspezifische Matrixsekretion und Markergenexpression jedoch in Abhängigkeit von den Trägermaterialien untersucht. Histologisch und immunhistochemisch zeigte sich die stärkste Anreicherung von Knorpelmatrixproteinen in agarosefreien Hydrogelen. Biochemisch war in allen Gelen eine ähnliche Kollagenanreicherung zu beobachten, während die Glykosaminoglykananreicherung in kollagenhaltigen Gelen ausgeprägter war. Molekularbiologisch konnte nachgewiesen werden, dass die knorpelspezifischen Markergene Aggrekan, „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP), „cartilage acidic protein“ (CRTAC), Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und SOX9 in der Anwesenheit von Hyaluronsäure teilweise ausgeprägter exprimiert wurden.

Hydrogele aus natürlichen Polymeren können die extrazelluläre Knorpelmatrix nachempfinden und die Bildung von neuem Gewebe fördern. Einige dieser Polymere sind bereits ein natürlicher Bestandteil der extrazellulären Knorpelmatrix und regulieren die Teilung, Adhäsion, Differenzierung und Migration der Zellen (Grande et al., 1997; Hoffman, 2002; Varghese & Elisseff, 2006). In der vorliegenden Arbeit war der Einfluss der Trägermaterialien auf die extrazelluläre Matrixanreicherung und knorpelspezifische Markergenexpression unterschiedlich (siehe Abbildungen 22-25 und 27-35). Die schwache Anreicherung von Knorpelmatrixproteinen in der Anwesenheit von Agarose (siehe Abbildungen 22-25), wie auch von Awad et al. (2004) und Huang et al. (2004) beobachtet, kann vermutlich zum Teil auf deren unkooperative Natur zurückgeführt werden. Fehlende Bindungsmöglichkeiten für mesenchymale Stammzellen (Awad et al., 2004; Batorsky et al., 2005; Zhang et al., 2012) und Proteine der Knorpelmatrix (Fedorovich et al., 2007) stellen ungünstige Bedingungen für die Bildung einer Knorpelmatrix dar. In vorliegender Arbeit war die inhomogene Zellverteilung in agarosehaltigen Gelen wahrscheinlich an der insgesamt schwachen Matrixsekretion beteiligt, welche in azellulären Gelbereichen ausblieb (siehe Abbildungen 22-24). Des Weiteren wird in der Literatur anders als in der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildung 34) von einer erhöhten Expression des Markergens Kollagen Typ X in Anwesenheit von Agarose berichtet (Estes et al., 2006), welches auf die Anwesenheit von hypertrophen Knorpelzellen hindeutet (Shen et al., 2005).

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Kollagen Typ I, Hyaluronsäure und Fibrin die knorpelspezifische Matrixsekretion begünstigen können. Kollagen und Hyaluronsäure wurden bereits erfolgreich als Trägermaterialien zur Generierung von Knorpelersatzgewebe verwendet (Facchini et al., 2006; Stark et al., 2006; Liao et al., 2007; Na et al., 2007; Freyria et al., 2008; Zheng et al., 2010; Kim et al., 2011). Dabei stellte sich heraus, dass diese die Sekretion von Knorpelmatrixproteinen wie Proteoglykane und Kollagen Typ II sowie die Expression des Markergens Kollagen Typ II fördern (Chen et al., 2005; Schagemann et al., 2006; Liao et al., 2007; Chung & Burdick, 2008; Hui et al., 2008; Ibrahim & Ramamurthi, 2008; Zheng et al., 2010; Matsiko et al., 2012; Levett et al., 2014). Interessant ist außerdem, dass dies auch in der Abwesenheit chondrogener Wachstumsfaktoren nachgewiesen wurde (Chung & Burdick, 2008; Zheng et al., 2010). Somit ist ein alleiniges chondrogenes Induktionspotential von Kollagen Typ I und Hyaluronsäure anzunehmen. In vorliegender Arbeit war die Anreicherung von Knorpelmatrixproteinen bei der Kombination von Kollagen Typ I und Hyaluronsäure am deutlichsten ausgeprägt (siehe Abbildungen 22 und 23), so wie dies von Liao et al. (2007) annähernd beschrieben wurde. Hier könnte jedoch diese Beobachtung das Resultat einer Matrixverdichtung bedingt durch die Schrumpfung der Hydrogele aus Kollagen Typ I und Hyaluronsäure sein (siehe Abbildung 21). Auch die Glykosaminoglykananreicherung lag in kollagenhaltigen Hydrogelen oberhalb der kollagenfreier Hydrogele (siehe Abbildung 28). Annähernd wie bei anderen Arbeitsgruppen (Schagemann et al., 2006; Chung & Burdick, 2008; Zheng et al., 2010; Matsiko et al., 2012; Levett et al., 2014) wurde in vorliegender Arbeit die Expression des Markergens Kollagen Typ II in kollagen- und hyaluronsäurehaltigen Gelen gezeigt (siehe Abbildung 33). Außerdem wurden hier die Markergene Aggrekan, COMP, CRTAC, Kollagen Typ I und SOX9 in Anwesenheit von Hyaluronsäure zum Teil ausgeprägter exprimiert (siehe Abbildungen 29-32 und 35).

Fibrin wird wegen seiner hohen Biokompatibilität, einfachen Gewinnung und Bindungsmöglichkeiten für mesenchymale Stammzellen häufig für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe verwendet (Raghunath et al., 2007; Balakrishnan & Banerjee, 2011). Die schnelle Degradation ist eine bekannte negative Eigenschaft von Fibrin (Lee et al., 2005; Eyrich et al., 2007a; Li et al., 2009). Ebenso hat Fibrin sowohl fördernde Eigenschaften (Lee et al., 2005; Ho et al., 2006; Dare et al., 2007; Huang et al., 2010) als auch negative Einflüsse auf Proliferation, Differenzierung und Matrixsekretion von mesenchymalen Stammzellen (Catelas et al., 2006; Haasper et al., 2008). In der Literatur wird auch von einer erhöhten Sekretion des Matrixproteins Kollagen Typ II und Expression der Markergene Aggrekan und Kollagen Typ II (Ho et al., 2006; Dare et al., 2007; Huang et al., 2010) in der Anwesenheit von Fibrin berichtet. Dies konnte in

vorliegender Arbeit lediglich bei der immunhistochemischen Untersuchung ähnlich beobachtet werden (siehe Abbildung 25), was jedoch nicht mit der schwach ausgeprägten Genexpression von Kollagen Typ II übereinstimmt (siehe Abbildung 33). Insgesamt war hier keine erhöhte und fördernde Wirkung von Fibrin auf die chondrogene Differenzierung von Fettgewebstammzellen im Vergleich zu Kollagen Typ I und Hyaluronsäure gegeben (siehe Abbildungen 22, 23, 27-33 und 35).

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit sowie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass es möglich ist, die knorpelspezifische Matrixsekretion und Markergenexpression mit den Trägermaterialien Kollagen Typ I und Hyaluronsäure neben dem Einfluss von Wachstumsfaktoren zusätzlich zu fördern.

4.5 Was sagt das Verhalten differenzierter Zell-Hydrogelkonstrukte in den Knorpeldefektmodellen über eine mögliche klinische Anwendbarkeit aus?

In vorliegender Arbeit wurden zellbesiedelte Hydrogelkombinationen aus Kollagen Typ I, Fibrin und Hyaluronsäure in Schweineohrknorpeldefekten *in vitro* untersucht. Vordifferenzierte Zell-Hydrogelkonstrukte lösten sich während der Kultivierung zum Teil aus den Defekten heraus, während in den Defekten verbliebene Gelkonstrukte keine Integration in den Nativknorpel aufwiesen. Letztere zwei Beobachtungen zeigten sich auch bei nicht-vordifferenzierten Gelkonstrukten, welche sich wie Hydrogelkombinationen aus Fibrin und Hyaluronsäure bereits nach einigen Tagen vollständig zersetzten. Histologisch und immunhistochemisch war in vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten eine stärkere Knorpelmatrixsekretion als in nicht-vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten zu beobachten. Analog zum *in vitro*-Modell wurden mit autologen Fettgewebstammzellen besiedelte, vordifferenzierte Hydrogelkombinationen aus denselben Polymeren sowie aus Agarose in Kaninchen-Ohrmuschelknorpeldefekten *in vivo* untersucht. Histologisch waren die Hydrogelkonstrukte bis auf minimale Reste agarosehaltiger Gele nach 6 Wochen im Nativgewebe nicht mehr nachweisbar. Reimplantierter autologer Knorpel gab Hinweise auf eine beginnende Integration, während Hydrogelkombinationen aus Agarose und Hyaluronsäure die Bildung von neuem Knorpelgewebe aufwiesen.

Das Regenerationspotential von Knorpel ist aufgrund einer spärlichen Verteilung sich nicht-teilender Chondrozyten, eines langsamen Matrixabbaus und eines sehr geringen Bestands an Vorläuferzellen begrenzt (Wang et al., 2005; Koga et al., 2009). Dadurch wurde die Forschung angeregt, Knorpelersatzgewebe zur Behandlung von

Knorpeldefekten zu entwickeln (Shieh et al., 2004; Ng et al., 2012). Eine langfristig erfolgreiche Regeneration von Knorpeldefekten erfordert die Integration des Ersatzgewebes in den umgebenden Nativknorpel (Vinardell et al., 2009). In vorliegender Arbeit wurden Knorpelersatzgewebe aus Fettgewebstammzellen und biokompatiblen Trägermaterialien hergestellt. Was sagt das Verhalten dieser Zell-Hydrogelkonstrukte in Knorpeldefekten *in vitro* und *in vivo* über eine mögliche klinische Anwendbarkeit aus? Mit ähnlicher Fragestellung haben sich auch andere Arbeitsgruppen bei der Untersuchung der klinischen Anwendbarkeit von Knorpelersatzgeweben in unterschiedlichen *in vitro*- und *in vivo*-Knorpeldefektmodellen beschäftigt. Auch hier ist ein Vergleich ihrer Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit nur teilweise möglich. Dies liegt daran, dass diese Gruppen entweder Knorpelzellen anstatt mesenchymale Stammzellen verwendeten oder ihre Untersuchungen mit Gelenknorpel durchführten.

Das Herauslösen vordifferenzierter Zell-Hydrogelkonstrukte im *in vitro*-Defektmodell (siehe Abbildung 36) verdeutlicht die Notwendigkeit einer zusätzlichen und langfristigen Fixierung der Konstrukte nach deren Implantation. Sollte eine Gelschrumpfung (siehe Abbildungen 21 und 40) für das Herauslösen mitverantwortlich sein, so ist diese ebenfalls zu minimieren. Bei der Defektfüllung mit Gelen im flüssigen Zustand (siehe Abbildung 38) ist eine schnelle Gelverfestigung nach der Füllung oder Injektion erforderlich, um ein Herauslaufen der Gele zu verhindern. Die Untersuchungsschwerpunkte des *in vitro*-Defektmodells lagen jedoch hauptsächlich bei der Integration der Zell-Hydrogelkonstrukte in den Nativknorpel sowie der Defektdeckung. Analog zur vorliegenden Arbeit (siehe Abbildungen 37 und 39) wurde auch von Hunziker (2001) über eine schlechte Integration von Knorpelersatzgewebe in Nativknorpel *in vitro* berichtet. In vorliegender Arbeit, wie bereits in Kapitel 4.3 diskutiert, hatten eine niedrige Zelldichte und Wachstumsfaktorkonzentration sowie eine zu kurze Induktionsdauer möglicherweise zu einer mangelnden Qualität der knorpelähnlichen Gewebe geführt. Dies könnte zum Teil für die jeweils ausbleibende Integration in den Nativknorpel und Defektdeckung im *in vitro*-Defektmodell verantwortlich sein (siehe Abbildungen 37 und 39). Des Weiteren wird in der Literatur von einem biologisch ungünstigen Umfeld für implantierte Konstrukte durch die Generierung von künstlichen Knorpeldefekten berichtet (Hunziker, 2001). Dieses wurde möglicherweise durch eine Zell-Apoptose und -Nekrose entlang der Schnittflächen verursacht (Shapiro et al., 1993; Tew et al., 2000).

Wesentlich ausgeprägter als in der vorliegenden Arbeit konnten andere Arbeitsgruppen zufriedenstellende Resultate wie eine Knorpelmatrixsekretion (Vinardell et al., 2009), die Bildung von neuem Knorpelgewebe (Ramallal et al., 2004) und eine Defektdeckung

(Maher et al., 2010) in *in vivo*-Defektmodellen zeigen. In vorliegender Arbeit hing die überwiegend ausbleibende Bildung von neuem Knorpelgewebe im *in vivo*-Modell sehr wahrscheinlich mit einem Abbau oder Umbau der Hydrogelkonstrukte in Bindegewebe zusammen (siehe Abbildung 41). Wie bereits erwähnt, werden endogene Substanzen wie Kollagen, Fibrin und Hyaluronsäure *in vivo* schnell abgebaut (Zheng et al., 2009; Balakrishnan & Banerjee, 2011; Burdick & Prestwich, 2011), während der Abbau von Agarose langsamer ist (Stokols et al., 2006; Gros et al., 2010). Dies konnte auch in vorliegender Arbeit im *in vivo*-Modell (siehe Abbildung 41) so beobachtet werden und zeigt, dass es also möglich ist, den Abbau endogener Substanzen durch die Kombination mit Agarose zu verlangsamen (Zhang et al., 2012). Die Degradierung von Trägermaterialien beeinflussen zu können, stellt für das Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe einen wichtigen Aspekt dar. So könnte die Resorption der Trägermaterialien auf die Bildungsgeschwindigkeit von neuem Knorpelgewebe angeglichen werden. Des Weiteren könnte in vorliegender Arbeit die überwiegend ausbleibende Bildung von neuem Knorpelgewebe (siehe Abbildung 41) mit einer Migration der Zellen aus den Konstrukten nach deren Implantation zusammenhängen. In der Literatur wird beschrieben, dass mesenchymale Stammzellen zunächst in sich regenerierenden Geweben verbleiben und dann migrieren (Muñoz-Elias et al., 2004; Francois et al., 2006; Winkler et al., 2008). Analog zum *in vitro*-Modell legt auch das *in vivo*-Modell durch die teils beobachtete Verschiebung der implantierten Zell-Hydrogelkonstrukte (siehe Abbildung 41) eine optimale Fixierung der Implantate nah.

Aus der Untersuchung der Zell-Hydrogelkonstrukte in den zwei verwendeten Defektmodellen stellt sich die Frage, inwieweit die Beobachtungen aus diesen auf die *in vivo*-Bedingungen im menschlichen Kehlkopf übertragbar sind. Hier wurden die Knorpeldefekte in Ohrknorpel, welcher aus elastischem Knorpel besteht (Kang et al., 2012), generiert (siehe Abbildungen 36 und 38). Das Kehlkopfskelett besteht jedoch bis auf die Epiglottis aus hyalinem Knorpel (Bauguera et al., 2011). Auch sollten Knorpeltransplantate in einem *in vivo*-Modell in klinisch relevante Stellen implantiert werden (ten Koppel et al., 2001). Das Kaninchenohrmuschel-Knorpeldefektmodell („rabbit pinna punch hole model“, ten Koppel et al., 2001) wurde deshalb gewählt, da der großflächige Kaninchenohrknorpel leicht zugänglich ist und mehrere Defekte im selben Kaninchenohr gleichzeitig untersucht werden können (siehe Abbildung 8). Des Weiteren sind die Implantate in den Defekten keiner mechanischen Belastung, wie sie z. B. in Kniegelenken auftritt, ausgesetzt (Bos et al., 2001). Daher ist ein Nachteil dieses Defektmodells, dass eine Beurteilung der Implantate in Bezug auf deren Eignung für mechanisch beanspruchtes Knorpelgewebe wie Gelenkknorpel nicht möglich ist. Ein

weiterer Nachteil ist, dass Kaninchen ein hohes Potential für spontane Heilung besitzen (Dell'Accio et al., 2003; Chu et al., 2010). Dadurch haben native Kaninchenknorpelzellen ein hohes Regenerationspotential (Bos et al., 2001), so dass reimplantierte autologe Knorpelstücke in den Nativknorpel integriert werden (siehe Abbildung 41) und einheilen (ten Koppel et al., 2001). Eine mit humanem Knorpel vergleichbare begrenzte Fähigkeit zur endogenen Reparatur ist bei adulten Schweinen besser gegeben als bei Kaninchen, wodurch Schweinemodelle eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen bieten (Chu et al., 2010).

Insgesamt zeigte sich bei der Untersuchung der Zell-Hydrogelkonstrukte in beiden Defektmodellen, dass eine mögliche klinische Anwendbarkeit der in der vorliegenden Arbeit generierten knorpelähnlichen Gewebe noch weit entfernt ist. Diese wird neben der optimierungsbedürftigen Qualität dieser Gewebe zusätzlich durch deren fehlende Integration in den Nativknorpel und die fehlende Defektdeckung behindert.

4.6 Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel können wegen genotoxischer Effekte auf Fettgewebstammzellen nur begrenzt als Zellmarker verwendet werden

Fettgewebstammzellen wurden hier mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln (VSOP) im Konzentrationsbereich von 1,5 μM bis 1,5 mM markiert. Die höchste VSOP-Konzentration entsprach in etwa 83,78 μg Eisen/ml. Markierte Zellen wiesen im Vergleich zu unmarkierten Zellen eine jeweils miteinander vergleichbare Proliferation, Migration, Vitalität und Koloniebildung auf. Analog zeigte sich dies bei der histologischen, biochemischen und molekularbiologischen Untersuchung des Multidifferenzierungspotentials. Nach der Markierung konnte keine signifikante Veränderung der Genexpression von Markern für Entzündungen, Apoptose und Angiogenese in Fettgewebstammzellen nachgewiesen werden. Bezüglich der genomischen Stabilität markierter Zellen wurde ein Anstieg der DNA-Fragmentierung und Chromosomenaberrationen mit steigender VSOP-Konzentration beobachtet. Für die höchste VSOP-Konzentration waren diese Veränderungen im Vergleich zu unmarkierten Zellen signifikant.

Aufgrund ihrer geringen Größe und guten Fähigkeit mit Magnetfeldern zu interagieren, werden superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel immer häufiger in der Biomedizin als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie eingesetzt (Mahmoudi et al., 2008). Die geringe Größe und große Oberfläche erhöht die Reaktivität und Diffusionsneigung der Partikel durch Membranen und Gewebebarrieren, was zu

zellulärem Stress führen kann. Durch die Funktionsbeeinträchtigung zellulärer Hauptkomponenten wie Mitochondrien und Zellkern können Nanopartikel zytotoxisch wirken (Oberdörster et al., 2007). Eine langfristige und effektive Anwendung von VSOP erfordert den Ausschluss negativer Wirkungen auf den Organismus (Bianco et al., 2008; Arbab et al., 2009). Analog zur vorliegenden Arbeit hat eine Vielzahl von Arbeitsgruppen untersucht, ob und in welchem Maße die Markierung unterschiedlicher Zellen mit VSOP zyto- und genotoxische Effekte mit sich bringt. Die biophysikalischen Partikeleigenschaften sowie die Partikelkonzentration und -größe waren zwischen den Gruppen verschieden, was teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen führte.

Analog zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildungen 42-44 und 50-54) wiesen andere Arbeitsgruppen keinen Einfluss von VSOP auf die Proliferation (Ju et al., 2006), Koloniebildung (Balakumaran et al., 2010) und Vitalität (Arbab et al., 2003; Heymer et al., 2008; Mahmoudi et al., 2009b; Hong et al., 2011a) mesenchymaler Stammzellen sowie auf das Migrationsverhalten von Fibroblasten (Shapiro et al., 2005) nach. Ebenso sahen andere Arbeitsgruppen das Multidifferenzierungspotential neuronaler (Bulte et al., 2001; Miyoshi et al., 2005) und mesenchymaler Stammzellen (Arbab et al., 2005; Farrell et al., 2008; Heymer et al., 2008) durch die Markierung mit VSOP unbeeinflusst, was auch den hier gezeigten Ergebnissen entspricht (siehe Abbildungen 45 und 47). Lediglich die Glykosaminoglykananreicherung war in Anwesenheit von VSOP signifikant niedriger (siehe Abbildung 48) als in unmarkierten Zellen. Heymer et al. (2008) zeigten das Multidifferenzierungspotential auch auf genetischer Ebene durch eine unveränderte Expression adipogener, osteogener und chondrogener Markergene, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deckt (siehe Abbildung 49). Da VSOP die Proliferation, Migration- und Koloniebildung sowie auch überwiegend das Multidifferenzierungspotential von Fettgewebstammzellen nicht verändern, kann eine zytotoxische Wirkung der Nanopartikel im hier verwendeten Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden.

Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildung 57) sahen auch Foldager et al. (2011) keinen Anstieg der Genexpression von Markern für Entzündungen, Apoptose und Angiogenese nach der Markierung von Knorpelzellen mit VSOP. Dies deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von VSOP die parakrine Sekretion der Zellen nicht verändert. In Hinsicht auf eine mögliche humane Anwendung von VSOP ist dies von hoher Relevanz, da Stammzellen mittels parakriner Sekretion ihre Umgebung *in vivo* beeinflussen können. Ein Anstieg der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 und Interleukin-8 könnte eine Entzündungsantwort und eventuell auch eine Revaskularisierung zur Folge

haben (Mukaida, 2000; Li et al., 2003; Galindo et al., 2011; Li & Fu, 2012). Letzteres ist auch bei einer erhöhten Sekretion des proangiogenen Faktors VEGF denkbar (Gnecchi et al., 2008).

Hong et al. (2011a) zeigten analog den Beobachtungen vorliegender Arbeit (siehe Abbildung 56) im Comet-Assay einen VSOP-konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Fragmentierung in Fibroblasten. Bhattacharya et al. (2009) sahen signifikante DNA-Schäden nach 24-stündiger Behandlung von Fibroblasten und Epithelzellen mit 50 µg Hämatit-Eisenoxidnanopartikel/cm². In der vorliegenden Arbeit wiesen diese Anstiege der DNA-Fragmentierung und Chromosomenaberrationen (siehe Abbildungen 55 und 56) auf eine genotoxische Wirkung von 1,5 mM VSOP hin. In der Literatur wird von einer Beteiligung von Fe³⁺-Ionen und reaktiven Sauerstoffspezies an der Entstehung von DNA-Schäden nach der Zellmarkierung mit VSOP berichtet (Singh et al., 2010). Die dadurch entstehende toxische Wirkung der Partikel kann zu Apoptose führen (Emerit et al., 2001). Da die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene genotoxische Wirkung von VSOP eine Interaktion zwischen den Nanopartikeln und der DNA im Zellkern signalisiert (Singh et al., 2010), kann eine mutagene Wirkung von VSOP nicht ausgeschlossen werden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, bieten sich z.B. der Soft Agar-Assay zur Untersuchung der malignen Transformation von Zellen oder Langzeit-Tierversuche an.

Die Anwendung von VSOP soll primär zum Nachweis markierter Zellen und deren Nachverfolgung mittels MRT dienen. Die Tatsache, dass die Partikel der vorliegenden Arbeit bei 1,5 mM genotoxisch sind, stellt für eine mögliche humane Anwendung einen limitierenden Faktor dar. Durch die Hinweise dieser genotoxischen Wirkung von VSOP können mögliche negative Folgen auch bei Konzentrationen unterhalb von 1,5 mM nicht sicher ausgeschlossen werden.

4.7 Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel signalisieren durch eine eingeschränkte Nachweisbarkeit markierter Fettgewebsstammzellen im Larynx die Notwendigkeit von alternativen Detektionsverfahren

Die Nachweisbarkeit VSOP-markierter Fettgewebsstammzellen mittels histologischer und physikalischer Detektionsverfahren wurde in vorliegender Arbeit untersucht. Zur Zellmarkierung wurden hierfür VSOP-Konzentrationen von 1,5 µM bis 1,5 mM verwendet. Im Zeitraum direkt nach der Markierung bis 28 Tage danach wurde die intrazelluläre Anwesenheit von VSOP mit der Berlinerblau-Färbung in markierten Zellen nachgewiesen. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnten VSOP in intrazellulären

Vesikeln dieser Zellen näher lokalisiert werden. Eine Abnahme der Nachweisbarkeit VSOP-markierter Zellen in Agarosegelen war mit der Magnetresonanztomographie (MRT) bei 11,7 Tesla und abnehmender VSOP-Konzentration zu sehen. Die Nachweisgrenze VSOP-markierter Zellen lag bei 0,3 mM VSOP. 6 Wochen nach der Injektion VSOP-markierter autologer Fettgewebstammzellen in Kaninchenstimmlippen konnten diese Zellen mittels MRT bei 11,7 Tesla nur noch vereinzelt nachgewiesen werden. Die Berlinerblau-Färbung bestätigte jedoch die Anwesenheit markierter Zellen in diesen Kaninchenstimmlippen im Injektionsbereich 12 Wochen nach der Injektion.

Die Entwicklung neuer Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie ist für die moderne Diagnostik von großer Bedeutung, ein Gebiet, auf dem VSOP immer häufiger Anwendung finden (Zhou et al., 2010). Ihre supermagnetische Eigenschaft manifestiert sich als Abwesenheit einer Restmagnetisierung nach Ablegen eines Magnetfelds, wodurch eine nachträgliche Agglomeration der Partikel minimiert wird (Corr et al., 2008). Die Beschichtung von VSOP mit Monomeren oder Polymeren ermöglicht eine Konjugation mit gewebespezifischen Liganden, die die Selektivität des Gewebekontrasts verbessern kann (Pirko et al., 2003; Veiseh et al., 2005; Reddy et al., 2006). Wie auch in vorliegender Arbeit, wurde die Nachweisbarkeit von VSOP-markierten Zellen auch von anderen Arbeitsgruppen untersucht. Diese haben VSOP-markierte mesenchymale Stammzellen (Heymer et al., 2008) sowie embryonale Stammzellen und Immunzellen (Stroh et al., 2005, 2006) mit der Berlinerblau-Färbung nachgewiesen. Dass es möglich ist, die Anwesenheit von VSOP in Endosomen markierter Fettgewebstammzellen mittels TEM nachzuweisen, haben auch Hong et al. (2011a) gezeigt. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit (siehe Abbildungen 58-60 und 63), in der diese Nachweisverfahren zur Überprüfung der intrazellulären Anwesenheit von VSOP hilfreich waren. Zusätzlich zeigte sich, dass die Aufnahme der Partikel sehr inhomogen war (siehe Abbildungen 58 A und 59 A). Mittels TEM konnte hier aufgrund des dunklen Kontrasts von Chromatin und der geringen Partikelgröße nicht nachgewiesen werden, ob VSOP in die Zellkerne markierter Zellen eindringen (siehe Abbildung 60).

Die Nachweisbarkeit VSOP-markierter Zellen mittels MRT wurde analog zur vorliegenden Arbeit auch von anderen Arbeitsgruppen untersucht. Die hier gesehene abnehmende Nachweisbarkeit VSOP-markierter Zellen in Abhängigkeit der VSOP-Konzentration zur Markierung (siehe Abbildung 61 A und B) wurde auch von Andreas et al. (2012) beobachtet. Analog wurde dies auch von Stroh et al. (2005), Wu et al. (2006) und Heymer et al. (2008) beobachtet, wobei die Abnahme der Nachweisbarkeit jedoch auf der Verwendung unterschiedlicher Zelldichten einheitlich markierter Zellen beruhte. In

vorliegender Arbeit wurde diese relativ gute Nachweisbarkeit VSOP-markierter Fettgewebstammzellen in Agarosegelen mittels MRT wahrscheinlich durch die Natur der Agarose unterstützt. Diese sorgte für einen homogenen Gewebekontrast (siehe Abbildung 61 C) und verhinderte möglicherweise die Migration markierter Zellen nach deren Einbettung in den Gelen. Die Nachweisgrenze der markierten Zellen lag hier bei 0,3 mM VSOP (siehe Abbildung 61). Gegenteilig hierzu waren Luft, unterschiedlich dichte Gewebe und die Auflösung des MRT für den inhomogenen Gewebekontrast in den Kaninchenkehlköpfen verantwortlich. Dieser wirkte sich negativ auf die Nachweisbarkeit der markierten, injizierten Zellen aus (siehe Abbildung 62). In der Literatur von einer schlechten Nachweisbarkeit VSOP-markierter Zellen, die durch Luft verursacht wird, berichtet (Schoen et al., 2010). So produzieren Lufteinschlüsse ebenso wie VSOP und dichte Gewebe wie z. B. Knochen und Knorpel ein negatives Signal im MRT und erscheinen somit schwarz. Daher ist eine effektive Anwendung von VSOP in Kombination mit MRT in Geweben einer geringeren Dichte besser gegeben (siehe Abbildung 61). Dies haben bisherige *in vivo*-Anwendungen in Rattenhirnen (Bulte et al., 2002; Fleige et al., 2001; Modo et al., 2002; Stroh et al., 2005; Xie et al., 2011) und Schweineherzen (Hill et al., 2003; Kraitchman et al., 2003) bereits gezeigt. Die schlechte Nachweisbarkeit VSOP-markierter Zellen in den Kaninchenstimmlippen kann auch mit einer nachträglichen Extrusion der injizierten Zellsuspension an der Injektionsstelle oder mit einer starken Zellmigration in das umliegende Gewebe zusammenhängen (Ikeda et al., 2000). Dass mesenchymale Stammzellen gewebeabhängig migrieren können (Muñoz-Elias et al., 2004; Francois et al., 2006; Winkler et al., 2008), wurde in vorliegender Arbeit bereits mehrfach erwähnt. Bei einer ausbleibenden Zellmigration sind im Injektionsbereich mehr markierte Zellen zu erwarten als dies mit der Berlinerblau-Färbung nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 63). Auch die inhomogene Aufnahme der Partikel durch die Zellen kann sich negativ auf die Nachweisbarkeit markierter Zellen auswirken. Die daraus resultierende Inhomogenität von VSOP in Geweben hat das Abklingen oder den Verlust des MR-Signals (Reichenbach et al., 1997) und somit auch die Verminderung der MRT-Bildqualität zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit wurden VSOP im MRT durch einen Signalverlust detektiert, was als negative Kontrasttechnik bekannt ist. Dadurch sind die Partikel in Geweben mit einem variierenden Kontrast jedoch nur schwer detektierbar. Eine Verbesserung stellt die positive Kontrasttechnik dar, da sie diesen Signalverlust als Bildkontrast-Quelle nutzt. Diese Technik generiert eine Phasenverschiebung des Hintergrundsignals, indem sie die MRT-Impulssequenzen so modifiziert, dass der ursprüngliche Gradient kompensiert wird. In der Abwesenheit der Nanopartikel resultiert daraus ein sehr dunkles Bild. Im Gegensatz

dazu wird in den Regionen, wo die Partikel anwesend sind, das Signal beibehalten und das Bild hell, da die Partikel die Phasenverschiebung des Gradienten kompensieren (Zhao et al., 2011). Ein weiteres Detektionsverfahren, mit dem VSOP-markierte Zellen erfasst werden können, ist Magnetic Particle Imaging (MPI). Nach der Langevin-Theorie des Paramagnetismus (Weizenecker et al., 2007) zeigen VSOP nichtlineare Magnetisierungskurven. Wird also ein externes Magnetfeld angelegt, richten sich die Partikel nach diesem aus. Nimmt dieses bis zur Überschreitung eines bestimmten Grenzwerts an Stärke zu, konvergiert die Magnetisierung zu einer Sättigung. In einem oszillierenden Magnetfeld, einem sogenannten Modulationsfeld, zeigen die Partikel eine zeitabhängige Magnetisierung. Mittels Fourier-Transformation des entstehenden Signals ist eine quantitative Messung der lokalen Nanopartikelkonzentration möglich (Gleich & Weizenecker, 2005; Bulte et al., 2008; Du et al., 2013). Dieses Verfahren kann die Verteilung von magnetischen Nanopartikeln in Materialien mit einer hohen zeitlichen Auflösung darstellen. Des Weiteren ist es sensitiver als MRT (Samavati, 2010), während eine räumliche Darstellung oder anatomische Zuordnung der Nanopartikel mit MPI jedoch nicht möglich ist.

Für eine optimale Verwendung von VSOP in der Laryngologie sind neben einem langfristig stabilen intrazellulären Eisengehalt in subtoxischen Konzentrationen vor allem alternative, nicht-invasive Nachweisverfahren, in denen die Partikel ein positives Signal hervorrufen, zu evaluieren.

4.8 Ausblick

Fettgewebe und Liposuktionsmaterial bieten den Vorteil, dass sie mit minimal invasiven Methoden gewonnen werden können und Quellen großer Mengen schnell proliferierender Stammzellen sind. Diese Zellen zeigen die für mesenchymale Stammzellen typischen Eigenschaften (Dominici et al., 2006) und sind der aktuellen Definition nach Fettgewebstammzellen (Bourin et al., 2013). Neben mehreren positiven Eigenschaften weisen diese Zellen auch immunogene Eigenschaften auf (Technau et al., 2011). Des Weiteren können DNA-Schädigungen und Chromosomenaberrationen (Froelich et al., 2013) eine maligne Transformation und die Interaktion mit Tumoren (Cousin et al., 2009; Seo et al., 2011) zur Folge haben. Da diese Zellen bereits in der regenerativen Medizin verwendet werden, sollten diese möglichen negativen Einflüsse für eine erfolgreiche humane Anwendung dieser Zellen tiefgründig untersucht und ausgeschlossen werden.

Die Wachstumsfaktoren TGF- β 3, BMP-6 und IGF-I erwiesen sich als potentielle Induktoren der chondrogenen Differenzierung von Fettgewebstammzellen. In der

Literatur wurde gezeigt, dass jeweils höhere Wachstumsfaktorkonzentrationen und Zelldichten sowie längere Induktionszeiten die knorpelspezifische Matrixsekretion und Markergenexpression verstärken können. Dies ist bei weiteren Optimierungen der Herstellung von Knorpelersatzgewebe aus Fettgewebstammzellen in Hydrogelen umzusetzen. Da auch die Trägermaterialien Kollagen Typ I und Hyaluronsäure einen fördernden Einfluss auf die chondrogene Differenzierung haben, sollten diese für das Tissue Engineering von Knorpelersatzgewebe bevorzugt werden. Neben den Gewährleistungen einer guten Geldurchmischung und homogenen Zellverteilung ist auch die Gelschrumpfung und dessen Abbau zu minimieren bzw. zu verlangsamen. Eine chemische Quervernetzung mit Zusatzstoffen oder anderen Trägermaterialien würde dabei hilfreich sein. Des Weiteren könnte die zusätzliche Kultivierung der Zell-Hydrogelkonstrukte in Bioreaktoren die Zufuhr von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren in alle Konstruktbereiche verbessern.

Die Verwendung vordifferenzierter Zell-Hydrogelkonstrukte ist für Kehlkopf-rekonstruktionen und Stimmlippenmedialisierungen in Kombination mit einer guten Implantatfixierung vorstellbar. Flüssige injizierbare Zell-Hydrogelgemische sind hingegen eher für Stimmlippenaugmentationen zu bevorzugen. Letztere Gelgemische sollten sich nach der Injektion schnell verfestigen, um eine nachträgliche Extrusion möglichst zu verhindern. Eine Quervernetzung dieser Gele mit Agarose wäre hierfür ebenfalls denkbar. Bei den zur Injektion vorgesehenen Zell-Hydrogelgemischen ist eine chondrogene Vordifferenzierung der Zellen in der Expansionsphase vor der Injektion notwendig. Für eine bessere Übertragbarkeit auf den menschlichen Kehlkopf sind *in vivo*-Untersuchungen in Schweinen zu evaluieren, in denen sich eine optimierte Qualität der Knorpelersatzgewebe als verbesserte Integration und Defektdeckung bemerkbar machen sollte.

Die Verwendung von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln als Zellmarker für Fettgewebstammzellen zeigte keine zytotoxischen Auswirkungen. Eine genotoxische Wirkung bei 1,5 mM VSOP limitiert jedoch deren Verwendung in der regenerativen Medizin. Für Konzentrationen unterhalb von 1,5 mM können negative Folgen jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Diese genotoxische Eigenschaft signalisiert eine Interaktion von VSOP mit der DNA, wodurch vor einer möglichen humanen Anwendung jegliche Mutagenität dieser Partikel ausgeschlossen werden muss. VSOP sind derzeit zum Nachweis von markierten Zellen im Larynx mittels MRT unvorteilhaft, da diese sehr klein sind, im MRT ein negatives Signal produzieren und der Gewebekontrast im Larynx inhomogen ist. Die inhomogene zelluläre Aufnahme von VSOP und eine starke Migration

markierter Zellen haben die schlechte Nachweisbarkeit vermutlich unterstützt. Die Konjugation der Nanopartikel mit spezifischen Antikörpern für mesenchymale Stammzellen könnte zumindest eine homogene Oberflächenmarkierung dieser Zellen bewirken. Eine MRT-Signalumkehrung von negativ nach positiv oder die Verwendung anderer sensiblerer Nachweisverfahren wie Magnetic Particle Imaging könnten das Problem der schlechten Nachweisbarkeit VSOP-markierter Zellen im Larynx mittels MRT lösen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Kehlkopf ist ein stimmerzeugendes knorpelhaltiges Organ und spielt eine wichtige Rolle in der Atemfunktion und beim aspirationsfreien Schluckakt. Funktionsstörungen des Kehlkopfs wie Stimmbandlähmungen werden durch Schädigungen des Kehlkopfnerve nach operativen Eingriffen und Halsverletzungen hervorgerufen. Des Weiteren führen durch Traumen, Teil- und komplette Resektionen verursachte Substanzdefekte des Kehlkopfs zu Funktionsverlusten. Die hierfür notwendigen und komplexen Rekonstruktionen werden durch das schlechte Regenerationspotential von Knorpelgewebe eingeschränkt und können nur bedingt durch synthetische Ersatzmaterialien oder körpereigenes Ersatzgewebe bewerkstelligt werden. Ist es möglich, mit Hilfe des Tissue Engineerings aus körpereigenen Stammzellen und biokompatiblen Trägermaterialien implantierbares Knorpelersatzgewebe herzustellen, welches zur dauerhaften Wiederherstellung der Kehlkopffunktionen eingesetzt werden kann? Die zusätzliche Markierung von Stammzellen mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln (VSOP) als Zellmarker bietet die Möglichkeit der Detektion und der Verfolgung der Zellen mittels nicht-invasiver Nachweismethoden nach deren Implantation. Ist die Verwendung dieser Nanopartikel ohne negative Folgen für die Stammzellen möglich und sind diese für den Einsatz in der Laryngologie geeignet?

Fettgewebstammzellen (ASC) wurden aus humanem Liposuktionsmaterial und Kaninchen-Nackenfett isoliert und expandiert. Die Zellen wurden in Hydrogelkombinationen aus Kollagen Typ-I, Agarose, Fibrin und Hyaluronsäure eingebettet und mit den chondrogenen Wachstumsfaktoren TGF- β 3, BMP-6 und IGF-I über 14 Tage differenziert. Anschließend wurden diese Zell-Hydrogelkonstrukte bezüglich Morphologie, extrazellulärer Matrixanreicherung und knorpelspezifischer Genexpression histologisch, immunhistochemisch und molekularbiologisch analysiert. In einem weiteren Schritt wurden die Integration der Zell-Hydrogelkonstrukte in natives Knorpelgewebe sowie die Defektdeckung in einem *in vitro*- und einem *in vivo*-Knorpeldefektmodell mit vor- und nicht-vordifferenzierten Zell-Hydrogelkonstrukten untersucht. Die Analyse möglicher zyto- und genotoxischer Effekte von VSOP sowie des Einflusses der Markierung von ASC mit VSOP auf die Proliferation, Migration und das Multidifferenzierungspotential erfolgte nach der Markierung der Zellen mit unterschiedlichen VSOP-Konzentrationen. Außerdem wurden VSOP-markierte ASC in Kaninchenstimmlippen injiziert und die Nachweisbarkeit dieser Zellen im Injektionsareal histologisch und mittels Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht.

Nach 14-tägiger chondrogener Differenzierung wurde in den Zell-Hydrogelkonstrukten eine knorpelähnliche Morphologie, die Anreicherung knorpelspezifischer Matrixproteine und die Expression chondrogener Markergene nachgewiesen. Die Kombination der chondrogenen Wachstumsfaktoren zeigte keinen verstärkenden Einfluss auf die Chondrogenese von ASC. Hydrogele aus Kollagen Typ I und Hyaluronsäure wiesen die stärkste extrazelluläre Matrixanreicherung auf. Bei den agarosefreien Hydrogelen war eine ausgeprägte Gelschrumpfung auffällig. In den beiden Knorpeldefektmodellen konnte weder eine Integration der Zell-Hydrogelkonstrukte in den Nativknorpel noch eine vollständige Defektdeckung nachgewiesen werden. Nach der Markierung von ASC mit VSOP zeigte sich bei der höchsten Konzentration von 1,5 mM eine genotoxische Wirkung. Zytotoxische Effekte sowie Einflüsse der Markierung auf die Proliferation, Migration und das Multidifferenzierungspotential von ASC waren nicht nachweisbar. VSOP-markierte ASC konnten nach deren Injektion in Kaninchenstimmlippen im Injektionsareal nur vereinzelt mittels MRT und histologisch nachgewiesen werden.

Es ist möglich, mit Hilfe des Tissue Engineerings aus körpereigenen Stammzellen und biokompatiblen Trägermaterialien implantierbares knorpelähnliches Gewebe herzustellen. Dabei begünstigen agarosefreie Trägermaterialien die chondrogene Differenzierung von ASC. Diese könnte durch die jeweilige Erhöhung der Zelldichte und Wachstumsfaktorkonzentrationen sowie die Verlängerung der Induktionszeit verstärkt werden. Eine mögliche klinische Anwendung dieser knorpelähnlichen Gewebe in der Laryngologie ist jedoch durch deren Schrumpfung wie auch mangelnde Integration und Defektdeckung noch weit entfernt. Aufgrund ihrer genotoxischen Wirkung kann eine Verwendung von VSOP als Zellmarker auch unterhalb von 1,5 mM ohne negative Folgen für den Organismus nicht sicher ausgeschlossen werden. Der inhomogene Gewebekontrast im Kehlkopf, die schlechte Auflösung im MRT und die geringe Größe von VSOP erschweren die Nachweisbarkeit und Verfolgung markierter Zellen mittels MRT. Daher sind andere nicht-invasive Nachweismethoden für die Verwendung von VSOP im Kehlkopf zu evaluieren. Der möglichen Anwendung dieser knorpelähnlichen Gewebe und VSOP in der rekonstruktiven Laryngologie muss eine erfolgreiche Optimierung und ausführliche positive Validierung in klinischen Tests vorausgehen.

6 SUMMARY

The larynx is a voice-producing and cartilage-containing organ that plays an important role in the respiratory function and aspiration-free swallowing. Dysfunctions of the larynx, such as vocal cord paralysis, are caused by damage to the laryngeal nerve after surgery and neck injuries. Furthermore, tissue defects caused by trauma and partial or complete resection of the larynx lead to loss of functions. The required and complex reconstructions are limited by the poor regeneration potential of cartilage, and can only be partially accomplished by synthetic graft materials or autologous replacement tissue. Is it possible to generate implantable cartilage replacement tissues that can be used for permanent restoration of laryngeal functions out of autologous stem cells and biocompatible scaffolds by the means of tissue engineering? The supplementary labeling of stem cells with very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles (VSOP) as cell markers offers the possibility to identify and trace the cells after their implantation using non-invasive detection methods. Can VSOP be used without negative consequences for the stem cells, and are these nanoparticles suitable for application in laryngology?

Adipose tissue-derived stem cells (ASC) were isolated from human liposuction material and rabbit nuchal fat. After expansion, the cells were embedded in hydrogel combinations of collagen type I, agarose, fibrin and hyaluronic acid and then differentiated with the chondrogenic growth factors TGF- β 3, BMP-6, and IGF-I for 14 days. Subsequently, these cell-seeded hydrogel constructs were analyzed histologically, immunohistochemically and molecular biologically regarding morphology, extracellular matrix accumulation and cartilage-specific gene expression. In a further step, the integration of pre- and non predifferentiated cell-seeded hydrogel constructs into native cartilage tissue and defect coverage were examined in cartilage defect models *in vitro* and *in vivo*. The analysis of potential cytotoxic and genotoxic effects of VSOP, as well as the influence of the nanoparticles on proliferation, migration, and multilineage potential of ASC, was performed after labeling the cells with different VSOP concentrations. In addition, VSOP-labeled ASC were injected into rabbit vocal folds and the detectability of these cells in the injection area was examined histologically and by magnetic resonance imaging (MRI).

A cartilage-like morphology, the accumulation of cartilage-specific matrix proteins and the expression of chondrogenic marker genes, was observed in the cell-seeded hydrogel constructs after 14 days of chondrogenic differentiation. The combination of the chondrogenic growth factors had no reinforcing effect on the chondrogenesis of ASC. Hydrogels of collagen type I and hyaluronic acid showed the strongest extracellular matrix

accumulation. A pronounced shrinkage was observed with agarose-free hydrogels. In the cartilage defect models neither an integration of the cell-seeded hydrogel constructs into the native cartilage nor a complete defect coverage were detected. The labeling of ASC with the highest VSOP concentration of 1.5 mM induced genotoxic effects. Cytotoxic effects and influences of labeling with VSOP on proliferation, migration and multilineage potential of ASC could not be observed. After their injection into rabbit vocal folds VSOP-labeled ASC were only sporadically detected histologically and by MRI in the injection area.

It is possible to generate implantable cartilage-like tissues out of autologous stem cells and biocompatible scaffolds by the means of tissue engineering. Here, agarose-free scaffolds promote the chondrogenic differentiation of ASC. This may be enhanced by increasing the cell density and growth factor concentrations as well as extending the induction time. Because of their shrinkage and the lack of integration and defect coverage, a possible clinical application of these cartilage-like tissues in laryngology is still far away. Due to the genotoxic effects of 1.5 mM VSOP, the use of these nanoparticles as cell markers without negative consequences for the organism cannot be ruled out with certainty at lower concentrations. The inhomogeneous tissue contrast in the larynx, a poor resolution in MRI and the small size of VSOP make labeled cells difficult to detect and trace in the larynx by MRI. Therefore, other non-invasive detection methods for the use of VSOP in the larynx have to be evaluated. The potential application of these cartilage-like tissues and VSOP in reconstructive laryngology must be preceded by successful optimization and extensive positive validation in clinical trials.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Aga	Agarose
ASC	Fettgewebstammzellen
Best.-Nr.	Bestellnummer
BMP-6	Knochen morphogenetisches Protein-6
BSF	fötale Kälberserum
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fib	Fibrin
h	Stunden
Hya	Hyaluronsäure
IGF-I	insulinähnlicher Wachstumsfaktor-I
Kol	Kollagen Typ I
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
MMS	Methylmethansulfonat
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymale Stammzellen
MTT	Thiazolylblau Tetrazoliumbromid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Pikogramm
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
sec	Sekunden
t-BHP	tert-Butylhydroperoxid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- β 3	transformierender Wachstumsfaktor- β 3
UV	ultraviolett
V	Volt
VSOP	superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel

7.2 Literaturverzeichnis

- Afanasyev BV, Elstner EE, Zander AR. (2009). A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cell Ther Transplant* 1, 35-37.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, De Crombrughe B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16, 2813-2828.
- Alaminos M, Sánchez-Quevedo MDC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. (2006). Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 3311-3317.
- Alexiou C, Schmid RJ, Jurgons R, Kremer M, Wanner G, Bergemann C, Huenges E, Nawroth T, Arnold W, Parak FG. (2006). Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *Eur Biophys J* 35, 446-450.
- Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ. (2002). Engineering growing tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12025-12030.
- Ambrosch P, Fazel A. (2011). Funktionserhaltende Therapie des Kehlkopf- und des Hypopharynxkarzinoms. *Laryngo-Rhino-Otologie* 90, 83-109.
- Andreas K, Georgieva R, Ladwig M, Mueller S, Notter M, Sittinger M, Ringe J. (2012). Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. *Biomaterials* 33, 4515-4525.
- Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA. (2003). Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* 229, 838-846.
- Arbab AS, Janic B, Haller J, Pawelczyk E, Liu W, Frank JA. (2009). In vivo cellular imaging for translational medical research. *Curr Med Imaging Rev* 5, 19-38.
- Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ, Frank JA. (2004). Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 104, 1217-1223.
- Arbab AS, Yocum GT, Rad AM, Khakoo AY, Fellowes V, Read EJ, Frank JA. (2005). Labeling of cells with ferumoxides-protamine sulfate complexes does not inhibit function or differentiation capacity of hematopoietic or mesenchymal stem cells. *NMR Biomed* 18, 553-559.
- Arens C. (2010). Open partial resection for malignant glottic tumors. In: *Remacle M, Eckel HE (eds.). Surgery of Larynx and Trachea. Springer Verlag Berlin Heidelberg*, 215-220.
- Arnold GE. (1963). Vocal rehabilitation of paralytic dysphonia: X. Functional results of intrachordal injection. *Arch Otolaryngol* 78, 179-186.

- Arold R, Laskawi R. (1986). Die Bedeutung der temporären Stimmlippenunterfütterung für die Behandlung der paralytischen Dysphonie. *Laryngo-Rhino-Otologie* 65, 5-6.
- Athanasίου KA, Shah AR, Hernandez RJ, LeBaron RG. (2001). Basic science of articular cartilage repair. *Clin Sports Med* 20, 223-247.
- Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F. (2003). Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 9, 1301-1312.
- Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25, 3211-3222.
- Badillo AT, Redden RA, Zhang L, Doolin EJ, Liechty KW. (2007). Treatment of diabetic wounds with fetal murine mesenchymal stromal cells enhances wound closure. *Cell Tissue Res* 329, 301-311.
- Baiguera S, Gonfiotti A, Jaus M, Comin CE, Paglierani M, Del Gaudio C, Bianco A, Ribatti D, Macchiaroni P. (2011). Development of bioengineered human larynx. *Biomaterials* 32, 4433-4442.
- Baijens L, Speyer R, Linssen M, Ceulen R, Manni JJ. (2007). Rejection of injectable silicone "Bioplastique" used for vocal fold augmentation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264, 565-568.
- Balakrishnan B, Banerjee R. (2011). Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chem Rev* 111, 4453-4474.
- Balakumaran A, Pawelczyk E, Ren J, Sworder B, Chaudhry A, Sabatino M, Stroncek D, Frank JA, Robey PG. (2010). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeling of bone marrow stromal (mesenchymal) cells does not affect their "stemness". *PLoS one* 5, e11462.
- Batorsky A, Liao J, Lund AW, Plopper GE, Stegemann JP. (2005). Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnol Bioeng* 92, 492-500.
- Bergamini G, Alicandri-Ciufelli M, Molteni G, Villari D, Luppi MP, Genovese E, Presutti L. (2010). Therapy of unilateral vocal fold paralysis with polydimethylsiloxane injection laryngoplasty: our experience. *J Voice* 24, 119-125.
- Berger C, Rausch M, Schmidt P, Rudin M. (2006). Feasibility and limits of magnetically labeling primary cultured rat T cells with ferumoxides coupled with commonly used transfection agents. *Mol Imaging* 5, 93-104.
- Bernardo ME, Emons JAM, Karperien M, Nauta AJ, Willemze R, Roelofs H, Romeo S, Marchini A, Rappold GA, Vukicevic S, Locatelli F, Fibbe WE. (2007). Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. *Connect Tissue Res* 48, 132-140.
- Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins RP, Hoffmann E, Dopp E. (2009). Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol* 6.
- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2, 313-319.
- Borges J, Lang EM, Stark GB. (2003). Tissue Engineering und regenerative Medizin in der rekonstruktiven Chirurgie. In: *Bruns J (Hrsg.). Tissue Engineering. Neues zum Gewebeersatz im Muskel-Skelett-System. Steinkopff Verlag Darmstadt*, 3-10.
- Bos PK, van Osch GJVM, Frenz DA, Verhaar JAN, Verwoerd-Verhoef HL. (2001). Growth factor expression in cartilage wound healing: temporal and spatial immunolocalization in a rabbit auricular cartilage wound model. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 382-389.
- Bosch P, Musgrave DS, Lee JY. (2000). Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 18, 933-944.

- Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 15, 641-648.
- Brandenburg JH, Kirkham W, Koschke D. (1992). Vocal cord augmentation with autogenous fat. *Laryngoscope* 102, 495-500.
- Bray GA. (2004). Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2583-2589.
- Brünings W. (1911). Über eine neue Behandlungsmethode der Rekurrenslähmung. *Verh Dtsch Laryngol* 18, 93-151.
- Brun P, Abatangelo G, Radice M, Zacchi V, Guidolin D, Daga GD, Cortivo R. (1999). Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res* 46, 337-346.
- Brunner E, Friedrich G, Kiesler K, Chibidziura-Priesching J, Gugatschka M. (2011). Subjective breathing impairment in unilateral vocal fold paralysis. *Folia Phoniatr Logop* 63, 142-146.
- Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark WJ. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol* 40, 4374-4381.
- Bryant SJ, Anseth KS. (2002). Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly (ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res* 59, 63-72.
- Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID, Frank JA. (2001). Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1141-1147.
- Bulte JW, Duncan ID, Frank JA. (2002). In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 899-907.
- Bulte JW, Gleich B, Weizenecker J, Bernard S, Walczak P, Markov DE, Aerts HC, Borgert J, Boeve H. (2008). Developing cellular MPI: initial experience. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 16, 1675.
- Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45, 115-120.
- Burdick JA, Prestwich GD. (2011). Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater* 23, H41-H56.
- Cansiz H, Yener HM, Sekercioglu N, Günes M. (2004). Laryngotracheal reconstruction with a muscle-pedicle hyoid bone flap: a series of 23 patients. *Ear Nose Throat J* 83, 424-427.
- Caplan AI. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Caplan AI. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213, 341-347.
- Carroll TL, Rosen CA. (2011). Long-term results of calcium hydroxylapatite for vocal fold augmentation. *Laryngoscope* 121, 313-319.
- Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. (1996). Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1624-1629.
- Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. (2011). Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells* 3, 25-33.
- Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JC, Helgerson S, Tawil B. (2006). Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng* 12, 2385-2396.

- Chang CH, Lin HY, Fang HW, Loo ST, Hung SC, Ho YC, Chen CC, Lin FH, Liu HC. (2008). Chondrogenesis from immortalized human mesenchymal stem cells: comparison between collagen gel and pellet culture methods. *Artif Organs* 32, 561-571.
- Chen CW, Tsai YH, Deng WP, Shih SN, Fang CL, Burch JG, Chen WH, Lai WF. (2005). Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *J Orthop Res* 23, 446-453.
- Chen WY, Abatangelo G. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 7, 79-89.
- Chhetri DK, Head C, Revazova E, Hart S, Bhuta S, Berke GS. (2004). Lamina propria replacement therapy with cultured autologous fibroblasts for vocal fold scars. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131, 864-870.
- Chu CR, Szczodry M, Bruno S. (2010). Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 105-115.
- Chung C, Burdick JA. (2008). Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Tissue Eng Part A* 15, 243-254.
- Cohnheim J. (1867). Über Entzündung und Eiterung. *Arch Path Anat* 40, 1-79.
- Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. (2006). Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 1471-1504.
- Corr SA, Rakovich YP, Gun'ko YK. (2008). Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. *Nanoscale Res Lett* 3, 87-104.
- Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, Touil I, André M, Grolleau JL, Péron JM, Chavoin JP, Bourin P, Pénicaud L, Casteilla L, Buscail L, Cordelier P. (2009). Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One* 4, e6278.
- Cummings CW, Purcell LL, Flint PW. (1993). Hydroxylapatite laryngeal implants for medialization. Preliminary report. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102, 843-851.
- Dare EV, Vascotto SG, Carlsson D, Hincke MT, Griffith M. (2007). Differentiation of a fibrin gel encapsulated chondrogenic cell line. *Int J Artif Organs* 30, 619-627.
- Dasgupta MG, George BS, Bhatia A, Sidhu OP. (2014). Characterization of *Withania somnifera* leaf transcriptome and expression analysis of pathogenesis-related genes during salicylic acid signaling. *PLoS one* 9, e94803.
- Dave SR, Gao X. (2009). Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 1, 583-609.
- Dedo HH, Carlsöö B. (1982). Histologic evaluation of Teflon granulomas of human vocal cords. A light and electron microscopic study. *Acta Otolaryngol* 93, 475-484.
- Dedo HH, Urrea RD, Lawson L. (1973). Intracordal injection of Teflon in the treatment of 135 patients with dysphonia. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 82, 661-667.
- Delaere PR, Hermans R. (2003). Tracheal autotransplantation as a new and reliable technique for the functional treatment of advanced laryngeal cancer. *Laryngoscope* 113, 1244-1251.
- Delaere PR, Vertriest R, Hermans R. (2003). Functional treatment of a large laryngeal chondrosarcoma by tracheal autotransplantation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112, 678-682.
- Dell'Accio F, Vanlauwe J, Bellemans J, Neys J, De Bari C, Luyten FP. (2003). Expanded phenotypically stable chondrocytes persist in the repair tissue and contribute to cartilage matrix formation and structural integration in a goat model of autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res* 21, 123-131.

- Dicker A, Le Blanc K, Åström G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, Arner P, Rydén M. (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308, 283-290.
- Dickhut A, Gottwald E, Steck E, Heisel C, Richter W. (2008). Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo. *Front Biosci* 13, 4517-4528.
- Dillon GP, Yu X, Sridharan A, Ranieri JP, Bellamkonda RV. (1998). The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed* 9, 1049-1069.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Dorvee JR, Boskey AL, Estroff LA. (2012). Rediscovering hydrogel-based double-diffusion systems for studying biomineralization. *CrystEngComm* 14, 5681-5700.
- Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P. (2003). Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 85, 740-747.
- Drury JL, Mooney DJ. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337-4351.
- Du Y, Lai PT, Leung CH, Pong PW. (2013). Design of superparamagnetic nanoparticles for magnetic particle imaging (MPI). *Int J Mol Sci* 14, 18682-18710.
- Emerit J, Beaumont C, Trivin F. (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother* 55, 333-339.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.
- Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 763-769.
- Erickson IE, Huang AH, Sengupta S, Kestle S, Burdick JA, Mauck RL. (2009). Macromer density influences mesenchymal stem cell chondrogenesis and maturation in photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 1639-1648.
- Estes BT, Wu AW, Guilak F. (2006). Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 54, 1222-1232.
- Even-Ram S. (2009). Fibrin gel model for assessment of cellular contractility. *Methods Mol Biol* 522, 251-259.
- Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, Staudenmaier R, Goepferich A, Blunk T. (2007a). Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 28, 55-65.
- Eyrich D, Wiese H, Maier G, Skodacek D, Appel B, Sarhan H, Tessmar J, Staudenmaier R, Wenzel MM, Goepferich A, Blunk T. (2007b). In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactonebased polyurethane scaffolds. *Tissue Eng* 13, 2207-2218.
- Facchini A, Lisignoli G, Cristino S, Roseti L, De Franceschi L, Marconi E, Grigolo B. (2006). Human chondrocytes and mesenchymal stem cells grown onto engineered scaffold. *Biorheology* 43, 471-480.
- Farrell E, Wielopolski P, Pavljasevic P, van Tiel S, Jahr H, Verhaar J, Bernsen M. (2008). Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 369, 1076-1081.

- Farwell DG, Birchall MA, Macchiarini P, Luu QC, de Mattos AM, Gallay BJ, Perez RV, Grow MP, Ramsamooj R, Salgado MD, Brodie HA, Belafsky PC. (2013). Laryngotracheal transplantation. *Laryngoscope* 123, 2502-2508.
- Fedorovich NE, Alblas J, de Wijn JR, Hennink WE, Verbout AJ, Dhert WJ. (2007). Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue Eng* 13, 1905-1925.
- Fleige G, Nolte C, Synowitz M, Seeberger F, Kettenmann H, Zimmer C. (2001). Magnetic labeling of activated microglia in experimental gliomas. *Neoplasia* 3, 489-499.
- Focke A, Schwarz S, Foerschler A, Scheibe J, Milosevic J, Zimmer C, Schwarz J. (2008). Labeling of human neural precursor cells using ferromagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med* 60, 1321-1328.
- Foldager CB, Pedersen M, Ringgaard S, Bünger C, Lind M. (2011). Chondrocyte gene expression is affected by very small iron oxide particles-labeling in long-term in vitro MRI tracking. *J Magn Reson Imaging* 33, 724-730.
- Ford CN, Bless DM. (1986). A preliminary study of injectable collagen in human vocal fold augmentation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 94, 104-112.
- Francois S, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Sache A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A. (2006). Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 24, 1020-1029.
- Freyria AM, Ronzière MC, Cortial D, Galois L, Hartmann D, Herbage D, Mallein-Gerin F. (2008). Comparative phenotypic analysis of articular chondrocytes cultured within type I or type II collagen scaffolds. *Tissue Eng Part A* 15, 1233-1245.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 331-340.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230-247.
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-390.
- Friedrich G. (1998a). Externe Stimmlippenmedialisierung: funktionelle Ergebnisse. *Laryngo-Rhino-Otologie* 77, 18-26.
- Friedrich G. (1998b). Externe Stimmlippenmedialisierung: operative Erfahrungen und Modifikationen. *Laryngo-Rhino-Otologie* 77, 7-17.
- Friedrich G. (1999). Titanium vocal fold medializing implant: introducing a novel implant system for external vocal fold medialization. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 108, 79-86.
- Froelich K, Mickler J, Friehs G, Technau A, Ramos Tirado M, Scherzed A, Hackenberg S, Radeloff A, Hagen R, Kleinsasser N. (2013). Chromosomal aberrations and DNA strand breaks in adipose-derived stem cells (ASC) during long-term expansion in vitro. *Cytotherapy* 15, 767-781.
- Froelich K, Pueschel RC, Birner M, Kindermann J, Hackenberg S, Kleinsasser NH, Hagen R, Staudenmaier R. (2010). Optimization of fibrinogen isolation for manufacturing autologous fibrin glue for use as scaffold in tissue engineering. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 38, 143-149.

- Froelich K, Setiawan LE, Technau A, Tirado MR, Hackenberg S, Hagen R, Staudenmaier R, Kleinsasser NH. (2012). Influence of different growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in polyurethane-fibrin composites. *Int J Artif Organs* 35, 1047-1060. Erratum in *Int J Artif Organs* (2013) 36, 73.
- Galindo LT, Filippo TR, Semedo P, Ariza CB, Moreira CM, Camara NO, Porcionatto MA. (2011). Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury. *Neurol Res Int*, 564089.
- Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Awadallah AS, Goldberg VM, Caplan AI. (2001). Tissue-engineered fabrication of an osteochondral composite graft using rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 7, 363-371.
- Gao Y. (2005). Biofunctionalization of magnetic nanoparticles. In: *Kumar C (ed.). Biofunctionalization of Nanomaterials 1, Wiley-VCH Weinheim, 72-98*
- Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. (2009). Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 52, 79-86.
- Gehmert S, Gehmert S, Hidayat M, Sultan M, Berner A, Klein S, Zellner J, Müller M, Prantl L. (2011). Angiogenesis: the role of PDGF-BB on adipose-tissue derived stem cells (ASCs). *Clin Hemorheol Microcirc* 48, 5-13.
- Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. (2010). Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther* 1, 19.
- Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. (2008). In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfus Med Hemother* 35, 228-238.
- Gimble JM, Guilak F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5, 362-369.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100, 1249-1260.
- Gimble JM. (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 3, 705-713.
- Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. (2012). Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 129, 1277-1290.
- Glatz FR, Kalkanis J, Neumeister M, Suchy H, Lyons S, Mowlavi A. (2003). Volume analysis of preadipocyte injection for vocal cord medialization. *Laryngoscope* 113, 1113-1117.
- Gleich B, Weizenecker J. (2005). Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature* 435, 1214-1217.
- Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 103, 1204-1219.
- Goni R, García P, Foissac S. (2009). The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Paper*, 1-9.
- Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S, Alini M. (2003a). The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials* 24, 5163-5171.
- Grad S, Zhou L, Gogolewski S, Alini M. (2003b). Chondrocytes seeded onto poly (L/DL-lactide) 80%/20% porous scaffolds: a biochemical evaluation. *J Biomed Mater Res Part A* 66, 571-579.
- Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. (1997). Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 34, 211-220.
- Grande DA. (1999). Cartilage tissue engineering: Current limitations and solutions. *Clin Orthop Relat Res* 367, 176-185.

- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81, 531-535.
- Gros T, Sakamoto JS, Blesch A, Havton LA, Tuszynski MH. (2010). Regeneration of long-tract axons through sites of spinal cord injury using templated agarose scaffolds. *Biomaterials* 31, 6719-6729.
- Gugala Z, Gogolewski S. (2000). In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold. *J Biomed Mater Res* 49, 183-191.
- Gugatschka M, Graupp M, Friedrich G. (2013). Applications of tissue engineering in modern laryngology. *Eur Surg* 45, 136-141.
- Guilak F, Awad HA, Fermor B, Leddy HA, Gimple JM. (2004). Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 41, 389-399.
- Guilak F, Estes BT, Diekman BO, Moutos FT, Gimple JM. (2010). 2010 Nicolas Andry Award: Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res* 468, 2530-2540.
- Gupta AK, Gupta M. (2005). Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 26, 1565-1573.
- Haasper C, Breitbart A, Hankemeier S, Wehmeier M, Hesse E, Citak M, Krettek C, Zeichen J, Jagodzinski M. (2008). Influence of fibrin glue on proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells seeded on a biologic 3-dimensional matrix. *Technol Health Care* 16, 93-101.
- Hahn MS, Teply BA, Stevens MM, Zeitels SM, Langer R. (2006). Collagen composite hydrogels for vocal fold lamina propria restoration. *Biomaterials* 27, 1104-1109.
- Halum SL, Naidu M, Delo DM, Atala A, Hingtgen CM. (2007). Injection of autologous muscle stem cells (myoblasts) for the treatment of vocal fold paralysis: a pilot study. *Laryngoscope* 117, 917-922.
- Halum SL, Postma GN, Koufman JA. (2005). Endoscopic management of extruding medialization laryngoplasty implants. *Laryngoscope* 115, 1051-1054.
- Hamid AA, Idrus RBH, Saim AB, Sathappan S, Chua KH. (2012). Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics* 67, 99-106.
- Harnden DG, Klinger HP. (1985). The International System for Human Cytogenetic Nomenclature: ISCN (1985): Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Karger Basel*, 1-117.
- Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F, Richter W. (2007). Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF-beta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol* 211, 682-691.
- Hertegard S, Cedervall J, Svensson B, Forsberg K, Maurer FH, Vidovska D, Olivius P, Ahrlund-Richter L, Le Blanc K. (2006). Viscoelastic and histologic properties in scarred rabbit vocal folds after mesenchymal stem cell injection. *Laryngoscope* 116, 1248-1254.
- Heymer A, Haddad D, Weber M, Gbureck U, Jakob PM, Eulert J, Nöth U. (2008). Iron oxide labeling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. *Biomaterials* 29, 1473-1483.
- Hill JM, Dick AJ, Raman VK, Thompson RB, Yu ZX, Hinds KA, Pessanha BS, Guttman MA, Varney TR, Martin BJ, Dunbar CE, McVeigh ER, Lederman RJ. (2003). Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation* 108, 1009-1014.
- Hinds KA, Hill JM, Shapiro EM, Laukkanen MO, Silva AC, Combs CA, Varney TR, Balaban RS, Koretsky AP, Dunbar CE. (2003). Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* 102, 867-872.

- Ho ST, Cool SM, Hui JH, Hutmacher DW. (2010). The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 31, 38-47.
- Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu BM. (2006). The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng* 12, 1587-1595.
- Hoffman AS. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 3-12.
- Honda M, Yada T, Ueda M, Kimata K. (2000). Cartilage formation by cultured chondrocytes in a new scaffold made of poly (L-lactide- ϵ -caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg* 58, 767-775.
- Hong SC, Lee JH, Lee J, Kim HY, Park JY, Cho J, Lee J, Han DW. (2011a). Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. *Int J Nanomedicine* 6, 3219-3231.
- Hong SJ, Lee SH, Jin SM, Kwon SY, Jung KY, Kim MK, Park H, Lee KW. (2011b). Vocal fold wound healing after injection of human adipose-derived stem cells in a rabbit model. *Acta Otolaryngol* 131, 1198-1204.
- Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC. (2007). Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev* 16, 597-604.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580.
- Huang CYC, Reuben PM, D'Ippolito G, Schiller PC, Cheung HS. (2004). Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 278, 428-436.
- Huang NF, Chu J, Lee RJ, Li S. (2010). Biophysical and chemical effects of fibrin on mesenchymal stromal cell gene expression. *Acta Biomater* 6, 3947-3956.
- Hubbell JA. (2003). Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 14, 551-558.
- Huber JE, Spievack A, Simmons-Byrd A, Ringel RL, Badylak S. (2003). Extracellular matrix as a scaffold for laryngeal reconstruction. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112, 428-433.
- Hui TY, Cheung KMC, Cheung WL, Chan D, Chan BP. (2008). In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials* 29, 3201-3212.
- Hunziker EB. (2001). Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 22-32.
- Hunziker EB. (2002). Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432-463.
- Ibrahim S, Ramamurthi A. (2008). Hyaluronic acid cues for functional endothelialization of vascular constructs. *J Tissue Eng Regen Med* 2, 22-32.
- Ikeda T, Kubo T, Nakanishi T, Arai Y, Kobayashi K, Mazda O, Ohashi S, Takahashi K, Imanishi J, Takigawa M, Hirasawa Y. (2000). Ex vivo gene delivery using an adenovirus vector in treatment for cartilage defects. *J Rheumatol* 27, 990-996.
- Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi SI, Mizuno H, Tawada M, You F, Yamada K, Tanaka Y, Egashira Y, Nakashima S, Yoshimura S, Iwama T. (2011). Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy* 13, 675-685.

- Indrawattana N, Chen GP, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J, Bunyaratvej A. (2004). Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 914-919.
- Isshiki N, Morita H, Okamura H, Hiramoto M. (1974). Thyroplasty as a new phonosurgical technique. *Acta Otolaryngol* 78, 451-457.
- Isshiki N, Okamura H, Ishikawa T. (1975). Thyroplasty type I (lateral compression) for dysphonia due to vocal cord paralysis or atrophy. *Acta Otolaryngol* 80, 465-473.
- Isshiki N, Taira T, Kojima H, Shoji K. (1989). Recent modifications in thyroplasty type I. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 98, 777-779.
- Isshiki N. (2000). Progress in laryngeal framework surgery. *Acta Otolaryngol* 120, 120-127.
- Ittrich H, Lange C, Dahnke H, Zander AR, Adam G, Nolte-Ernsting C. (2005). Untersuchungen zur Markierung von mesenchymalen Stammzellen mit unterschiedlichen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln und Nachweisbarkeit in der MRT bei 3T. *Fortschr Röntgenstr* 177, 1151-1163.
- Jeng HA, Swanson J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 41, 2699-2711.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie C. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Johnson BQ, Fox R, Chen X, Thibeault S. (2010). Tissue regeneration of the vocal fold using bone marrow mesenchymal stem cells and synthetic extracellular matrix injections in rats. *Laryngoscope* 120, 537-545.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238, 265-272.
- Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, Johannsen M, Wust P, Nadobny J, Schirra H, Schmidt H, Deger S, Loening S, Lanksch W, Felix RJ. (2001). Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *J Magn Magn Mater* 225, 118-126.
- Ju S, Teng G, Zhang Y, Ma M, Chen F, Ni Y. (2006). In vitro labeling and MRI of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Magn Reson Imaging* 24, 611-617.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11, 447-455.
- Juusola J, Ballantyne J. (2007). mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci* 52, 1252-1262.
- Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Kojima H, Magruffov A, Hiratsuka Y, Hirano S, Ito J, Shimizu Y. (2003). Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112, 915-920.
- Kanemaru S, Nakamura T, Yamashita M, Magruffov A, Kita T, Tamaki H, Tamura Y, Iguchi F, Kim TS, Kishimoto M, Omori K, Ito J. (2005). Destiny of autologous bone marrow-derived stromal cells implanted in the vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114, 907-912.
- Kang JW, Kang KS, Koo HC, Park JR, Choi EW, Park YH. (2008). Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17, 681-693.
- Kang N, Liu X, Guan Y, Wang J, Gong F, Yang X, Yan L, Wang Q, Fu X, Cao Y, Xiao R. (2012). Effects of co-culturing BMSCs and auricular chondrocytes on the elastic modulus and hypertrophy of tissue engineered cartilage. *Biomaterials* 33, 4535-4544.

- Karpenko AN, Dworkin JP, Meleca RJ, Stachler RJ. (2003). Cymetra injection for unilateral vocal fold paralysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112, 927-934.
- Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. (2005). Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 23, 412-423.
- Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM, Barry F. (2002). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38, 457-466.
- Kelly DJ, Jacobs CR. (2010). The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90, 75-85.
- Kelly TA, Wang CC, Mauck RL, Ateshian GA, Hung CT. (2004). Role of cell-associated matrix in the development of free-swelling and dynamically loaded chondrocyte-seeded agarose gels. *Biorheology* 41, 223-237.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301.
- Kim BS, Hrkach JS, Langer R. (2000). Synthesis and characterization of novel degradable photocrosslinked poly (ether-anhydride) networks. *J Polym Sci A Polym Chem* 38, 1277-1282.
- Kim HJ, Im GI. (2009). Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Greater doses of growth factor are necessary. *J Orthop Res* 27, 612-619.
- Kim IL, Mauck RL, Burdick JA. (2011). Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid. *Biomaterials* 32, 8771-8782.
- Kleinsasser N. (2005). Chondrosynthese des laryngo-trachealen-Skeletts mit resorbierbaren Stiften und Platten. *Laryngo-Rhino-Otologie* 84, 8-12.
- Kleinsasser NH, Priemer FG, Schulze W, Kleinsasser OF. (2000). External trauma to the larynx: classification, diagnosis, therapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257, 439-444.
- Kleinsasser O, Schroeder HG, Glanz H. (1982). Medianverlagerung gelähmter Stimmlippen mittels Knorpelspanimplantation und Türflügelthyreoplastik. *HNO* 30, 275-279.
- Kleinsasser O. (1991). Mikrolaryngoskopie und endolaryngeale Mikrochirurgie, *Schattauer Verlag Stuttgart*.
- Knecht R, Baghi M. (2009). Eingriffe bei malignen Erkrankungen des Larynx und des Hypopharynx. In: *Reiß, M (Hrsg.). Facharztwissen HNO-Heilkunde. Differenzierte Diagnostik und Therapie. Springer Medizin Verlag Heidelberg*, 977-983.
- Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. (2009). Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17, 1289-1297.
- Kohler N, Sun C, Fichtenholtz A, Gunn J, Fang C, Zhang M. (2006). Methotrexate-immobilized poly (ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery. *Small* 2, 785-792.
- Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, Hare JM, Bulte JW. (2003). In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 107, 2290-2293.
- Kuhbier JW, Weyand B, Radtke C, Vogt PM, Kasper C, Reimers K. (2010). Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 123, 55-105.
- Kumai Y, Kobler JB, Park H, Galindo M, Herrera VLM, Zeitels SM. (2010). Modulation of vocal fold scar fibroblasts by adipose derived stem/stromal cells. *Laryngoscope* 120, 330-337.

- Kumai Y, Kobler JB, Park H, Lopez-Guerra G, Karajanagi S, Herrera VL, Zeitels SM. (2009). Crosstalk between adipose-derived stem/stromal cells and vocal fold fibroblasts in vitro. *Laryngoscope* 119, 799-805.
- Kutty JK, Webb K. (2009). Tissue engineering therapies for the vocal fold lamina propria. *Tissue Eng B Rev* 15, 249-262.
- Kwon TK, Buckmire R. (2004). Injection laryngoplasty for management of unilateral vocal fold paralysis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12, 538-542.
- Laccourreye O, Papon JF, Kania R, Crevier-Buchman L, Brasnu D, Hans S. (2009). Intracordal injection of autologous fat in patients with unilateral laryngeal nerve paralysis: long-term results from the patient's perspective. *Laryngoscope* 113, 541-545.
- Lake SP, Barocas VH. (2011). Mechanical and structural contribution of non-fibrillar matrix in uniaxial tension: a collagen-agarose co-gel model. *Ann Biomed Eng* 39, 1891-1903.
- Lake SP, Hald ES, Barocas VH. (2011). Collagen-agarose co-gels as a model for collagen-matrix interaction in soft tissues subjected to indentation. *J Biomed Mater Res A* 99, 507-515.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, Muller RN. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev* 108, 2064-2110.
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439-1441.
- Lee BJ, Wang SG, Lee JC, Jung JS, Bae YC, Jeong HJ, Kim HW, Lorenz RR. (2006). The prevention of vocal fold scarring using autologous adipose tissue-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs* 184, 198-204.
- Lee CR, Grad S, Gorna K, Gogolewski S, Goessl A, Alini M. (2005). Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: a preliminary analysis. *Tissue Eng* 11, 1562-1573.
- Lee GM, Loeser RF. (1999). Cell surface receptors transmit sufficient force to bend collagen fibrils. *Exp Cell Res* 248, 294-305.
- Lee KY, Mooney DJ. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101, 1869-1880.
- Lenarz T, Boenninghaus HG. (2012). Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. *Springer Verlag*.
- Levett PA, Melchels FP, Schrobback K, Hutmacher DW, Malda J, Klein TJ. (2014). A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Acta Biomater* 10, 214-223.
- Levi B, Longaker MT. (2011). Concise review: adipose-derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells* 29, 576-582.
- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunology* 170, 3369-3376.
- Li H, Fu X. (2012). Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res* 348, 371-377.
- Li WJ, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS. (2005). A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26, 599-609.
- Li Z, Kupcsik L, Yao SJ, Alini M, Stoddart MJ. (2009). Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stem cells in fibrin-polyurethane composites. *Tissue Eng A* 15, 1729-1737.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2, 329-333.

- Liang Q, Liu S, Han P, Li X, Li X, Zhao Y, Liang Y, Deng Z, Jin Y. (2012). Micronized acellular dermal matrix as an efficient expansion substrate and delivery vehicle of adipose-derived stem cells for vocal fold regeneration. *Laryngoscope* 122, 1815-1825.
- Liao E, Yaszemski M, Krebsbach P, Hollister S. (2007). Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen I hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Eng* 13, 537-550.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-delta delta C(T))} method. *Methods* 25, 402-408.
- Long JL, Zuk P, Berke GS, Chhetri DK. (2010). Epithelial differentiation of adipose-derived stem cells for laryngeal tissue engineering. *Laryngoscope* 120, 125-131.
- Lorenz KJ. (2014). Stimmrehabilitation nach Laryngektomie. *Laryngo-Rhino-Otologie* 93, 44-66.
- Maher SA, Mauck RL, Rackwitz L, Tuan RS. (2010). A nanofibrous cell seeded hydrogel promotes integration in a cartilage gap model. *J Tissue Eng Regen Med* 4, 25-29.
- Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Milani AS, Stroeve P. (2008). Optimal design and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with polyvinyl alcohol for targeted delivery and imaging. *J Phys Chem B* 112, 14470-14481.
- Mahmoudi M, Simchi A, Imani M. (2009a). Cytotoxicity of uncoated and polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Phys Chem C* 113, 9573-9580.
- Mahmoudi M, Simchi A, Milani AS, Stroeve P. (2009b). Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 336, 510-518.
- Maier H, Tisch M, Lorenz KJ, Danz B, Schramm A. (2011). Penetrierende Gesichts- und Halsverletzungen. *HNO* 59, 765-782.
- Matsiko A, Levingstone TJ, O'Brien FJ, Gleeson JP. (2012). Addition of hyaluronic acid improves cellular infiltration and promotes early-stage chondrogenesis in a collagen-based scaffold for cartilage tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* 11, 41-52.
- Mauck RL, Soltz MA, Wang CC, Wong DD, Valhmu WB, Hung CT, Ateshian GA. (2000). Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J Biomech Eng* 122, 252-260.
- McCall MN, McMurray HR, Land H, Almudevar A. (2014). On non-detects in qPCR data. *Bioinformatics* 30, 2310-2316.
- McCulloch TM, Andrews BT, Hoffman HT, Graham SM, Karnell MP, Minnick C. (2002). Long-term follow-up of fat injection laryngoplasty for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope* 112, 1235-1238.
- McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. (2006). The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 24, 1246-1253.
- Meyer U, Wiesmann HP. (2006). Bone and cartilage engineering. *Springer Verlag*.
- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Halvorsen YD, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24, 376-385.
- Miyoshi S, Flexman JA, Cross DJ, Maravilla KR, Kim Y, Anzai Y, Oshima J, Minoshima S. (2005). Transfection of neuroprogenitor cells with iron nanoparticles for magnetic resonance imaging tracking: cell viability, differentiation, and intracellular localization. *Mol Imaging Biol* 7, 286-295.
- Modo M, Cash D, Mellodew K, Williams SC, Fraser SE, Meade TJ, Price J, Hodges H. (2002). Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 17, 803-811.

- Mohan R, Iyer R, Thaller S. (2009). Airway management in patients with facial trauma. *J Craniofac Surg* 20, 21-23.
- Molteni G, Bergamini G, Ricci-Maccarini A, Marchese C, Ghidini A, Alicandri-Ciufelli M, Luppi MP, Presutti L. (2010). Auto-crosslinked hyaluronan gel injections in phonosurgery. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 142, 547-553.
- Montgomery WW, Montgomery SK. (1990). Manual for use of Montgomery laryngeal, tracheal, and esophageal prostheses: update 1990. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 150, 2-28.
- Moonis G, Dyce O, Loevner LA, Mirza N. (2005). Magnetic resonance imaging of micronized dermal graft in the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114, 593-598.
- Mukaida N. (2000). Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 72, 391-398.
- Mullis KB. (1987). Process for amplifying nucleic acid sequences. *U.S. Patent No. 4,683,202*.
- Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. (2004). Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci* 24, 4585-4595.
- Na K, Kim S, Woo DG, Sun BK, Yang HN, Chung HM, Park KH. (2007). Synergistic effect of TGFbeta-3 on chondrogenic differentiation of rabbit chondrocytes in thermo-reversible hydrogel constructs blended with hyaluronic acid by in vivo test. *J Biotechnol* 128, 412-422.
- Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. (1991). Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res* 9, 465-470.
- Natesan S, Baer DG, Walters TJ, Babu M, Christy RJ. (2010). Adipose-derived stem cell delivery into collagen gels using chitosan microspheres. *Tissue Eng A* 16, 1369-1384.
- Nawka T, Wirth G. (2008). Stimmstörungen. Für Ärzte, Logopäden, Sprachheilpädagogen und Sprechwissenschaftler; mit 30 Tabellen. *Deutscher Ärzte-Verlag Köln*, 1-452.
- Ng KW, Wanivenhaus F, Chen T, Hsu HC, Allon AA, Abrams VD, Torzilli PA, Warren RF, Maher SA. (2012). A Novel Macroporous Polyvinyl Alcohol Scaffold Promotes Chondrocyte Migration and Interface Formation in an In Vitro Cartilage Defect Model. *Tissue Eng A* 18, 1273-1281.
- Oberdörster G, Stone V, Donaldson K. (2007). Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology* 1, 2-25.
- Olive PL, Durand RE, Le Riche J, Olivotto IA, Jackson SM. (1993). Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Res* 53, 733-736.
- Ossendorf C, Kaps C, Kreuz PC, Burmester GR, Sittlinger M, Erggelet C. (2007). Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: two year clinical results. *Arthritis Res Ther* 9, R41.
- Owen M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76.
- Pagedar NA, Listinsky CM, Tucker HM. (2009). An unusual presentation of Teflon granuloma: case report and discussion. *Ear Nose Throat J* 88, 746-747.
- Paniello RC. (2004). Laryngeal reinnervation. *Otolaryngol Clin North Am* 37, 161-181.
- Park H, Karajanagi S, Wolak K, Aanestad J, Daheron L, Kobler JB, Lopez-Guerra G, Heaton JT, Langer RS, Zeitels SM. (2010). Three-dimensional hydrogel model using adipose-derived stem cells for vocal fold augmentation. *Tissue Eng A* 16, 535-543.
- Park H, Temenoff JS, Tabata Y, Caplan AI, Mikos AG. (2007). Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 28, 3217-3227.

- Park SN, Park JC, Kim HO, Song MJ, Suh H. (2002). Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 23, 1205-1212.
- Payr E. (1915). Plastik am Schildknorpel zur Behebung der Folgen einseitiger Stimmlippenlähmung. *Dtsch med Wschr* 43, 1265-1270.
- Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. (2006). Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Adv Mater* 18, 1345-1360.
- Peppas NA, Huang Y, Torres-Lugo M, Ward JH, Zhang J. (2000). Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annu Rev Biomed Eng* 2, 9-29.
- Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, Bennett DL, Orenge C, Kohl M. (2012). ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics* 13, 296.
- Pettersson P, Van RLR, Lönnroth P, Björntorp P, Smith U. (1985). Insulin binding in differentiating rat preadipocytes in culture. *J Lipid Res* 26, 1187-1195.
- Phillips HJ. (1973). Dye exclusion test for cell viability In Tissue Culture Methods and Applications. *Academic Press New York*, 406-408.
- Pirko I, Johnson AJ, Rodriguez M, Macura SI. (2003). Immuno-imaging: cell-selective in vivo NMR microscopy in experimental animals. *Proc Int Soc Mag Reson Med* 11, 832.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Pochampally R. (2008). Colony Forming Unit Assays for MSCs. *Methods Mol Biol* 449, 83-91.
- Prantl L, Muehlberg F, Navone NM, Song YH, Vykoukal J, Logothetis CJ, Alt EU. (2010). Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth. *Prostate* 70, 1709-1715.
- Prockop DJ. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG. (2010). Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng B Rev* 16, 435-444.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. (2005). Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 129, 118-129.
- Raghunath J, Rollo J, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. (2007). Biomaterials and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. *Biotechnol Appl Biochem* 46, 73-84.
- Ragusa M, Majorana A, Statello L, Maugeri M, Salito L, Barbagallo D, Guglielmino MR, Duro LR, Angelica R, Caltabiano R, Biondi A, Di Vita M, Privitera G, Scalia M, Cappellani A, Vasquez E, Lanzafame S, Basile F, Di Pietro C, Purrello M. (2010). Specific alterations of microRNA transcriptome and global network structure in colorectal carcinoma after cetuximab treatment. *Mol Cancer Ther* 9, 3396-3409.
- Ramallal M, Maneiro E, López E, Fuentes-Boquete I, López-Armada MJ, Fernández-Sueiro JL, Galdo F, De Toro FJ, Blanco FJ. (2004). Xeno-implantation of pig chondrocytes into rabbit to treat localized articular cartilage defects: an animal model. *Wound Repair Regen* 12, 337-345.
- Rao RR, Peterson AW, Ceccarelli J, Putnam AJ, Stegemann JP. (2012). Matrix composition regulates three-dimensional network formation by endothelial cells and mesenchymal stem cells in collagen/fibrin materials. *Angiogenesis* 15, 253-264.

- Reddy GR, Bhojani MS, McConville P, Moody J, Moffat BA, Hall DE, Kim G, Koo YE, Woolliscroft MJ, Sugai JV, Johnson TD, Philbert MA, Kopelman R, Rehemtulla A, Ross BD. (2006). Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin Cancer Res* 12, 6677-6686.
- Reichenbach JR, Venkatesan R, Yablonskiy DA, Thompson MR, Lai S, Haacke EM. (1997). Theory and application of static field inhomogeneity effects in gradient-echo imaging. *J Magn Reson Imaging* 7, 266-279.
- Reiter R, Hoffmann TK, Rotter N, Pickhard A, Scheithauer MO, Brosch S. (2014). Ätiologie, Diagnostik, Differenzialdiagnostik und Therapie von Stimmlippenpareesen. *Laryngo-Rhino-Otologie* 93, 161-173.
- Remacle M, Lawson G. (2007). Results with collagen injection into the vocal folds for medialization. *Curr Opin Otol Head Neck Surg* 15, 148-152.
- Rodbell M. (1964). Metabolism of Isolated Fat Cells: I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239, 375-380.
- Roemeling-van Rhijn M, Reinders ME, de Klein A, Douben H, Korevaar SS, Mensah FK, Dor FJ, Jzermans JN, Betjes MG, Baan CC, Weimar W, Hoogduijn MJ. (2012). Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue are not affected by renal disease. *Kidney Int* 82, 748-758.
- Rohner D, Bucher P, Kunz C, Hammer B, Schenk RK, Prein J. (2002). Treatment of severe atrophy of the maxilla with the prefabricated free vascularized fibula flap. *Clinical Oral Implants Res* 13, 44-52.
- Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L. (1999). Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys J* 77, 2813-2826.
- Safarik I, Safarikova M. (2004). Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagn Res Technol* 2, 7.
- Samavati N. (2010). Magnetic Particle Imaging.
- San Martin S, Alaminos M, Zorn TMT, Sánchez-Quevedo MC, Garzón I, Rodríguez IA, Campos A. (2013). The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med* 7, 10-19.
- Sasaki CT, Isaacson G. (1988). Functional anatomy of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am* 21, 595-612.
- Schagemann JC, Mrosek EH, Landers R, Kurz H, Erggelet C. (2006). Morphology and function of ovine articular cartilage chondrocytes in 3-D hydrogel culture. *Cells Tissues Organs* 182, 89-97.
- Schiebler T, Schmidt W. (1997). Anatomie. *Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York*, 1-350.
- Schild TA. (1998). Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. *Applied Biosystems, Weiterstadt*.
- Schipper J, Leffler M, Maier W, Kopp J, Bach AD, Horch RE. (2006). Rekonstruktion von tumorbedingten Defekten in der Kopf-Hals-Chirurgie mit individualisierten dreidimensionalen Lappen unter Anwendung der Vakuumtherapie. *Zentralbl Chir* 131, 141-145.
- Schoen I, Angenstein F, Neumann K, Roepke E. (2010). Detection of autologous chondrocytes at polyethylene scaffolds in vivo - experimental study. In: *Buzug TM, Borgert J, Knopp T, Biederer S, Sattel TF, Erbe M, Lüdtk-Buzug K (eds.). Magnetic Nanoparticles: Particle Science, Imaging Technology, and Clinical Applications. Proceedings of the First International Workshop on Magnetic Particle Imaging. World Scientific Publishing, Singapore*, 224-230.
- Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. (2005). Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* 26, 359-371.

- Seidl RO, Todt I, Haider E, Ernst A. (2008). Verletzungen des Larynx und der Trachea. *Trauma Berufskrankh* 10, 201-208.
- Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. (2001). BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 284, 411-418.
- Seo KW, Lee HW, Oh YI, Ahn JO, Koh YR, Oh SH, Kang SK, Youn HY. (2011). Anti-tumor effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cell-based interferon- β gene therapy and cisplatin in a mouse melanoma model. *Cytotherapy* 13, 944-955.
- Shapiro EM, Skrtic S, Koretsky AP. (2005). Sizing it up: Cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med* 53, 329-338.
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. (1993). Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 75, 532-553.
- Shelton JC, Bader DL, Lee DA. (2002). Mechanical conditioning influences the metabolic response of cell-seeded constructs. *Cells Tissues Organs* 175, 140-150.
- Shen G. (2005). The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* 8, 11-17.
- Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP. (2004). Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 25, 1545-1557.
- Shiel WC. (2012). Magnetic resonance imaging (MRI scan). MedicineNet.com.
- Shoichet MS, Li RH, White ML, Winn SR. (1996). Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnol Bioeng* 50, 374-381.
- Siegert R, Witte J, Jurk V, Kunisch M, Katzbach R, Remmert S. (2002). Rekonstruktion nach ausgedehnten Larynx- und Hypopharynxteilresektionen. Eine neue Methode mit Rippenknorpel, Chondrosynthese und freien Radialistransplantaten. *HNO* 50, 829-835.
- Silverman RP, Bonasser L, Passaretti D, Randolph MA, Yaremchuk MJ. (2000). Adhesion of tissue-engineered cartilage to native cartilage. *Plast Reconstr Surg* 105, 1393-1398.
- Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH. (2010). Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev* 1, 5358.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Sittel C, Bosch N, Plinkert PK. (2008). Operative Stimmrehabilitation bei einseitiger Lähmung des N. laryngeus inferior (recurrens). *Der Chirurg* 79, 1055-1064.
- Sittel C, Echternach M, Federspil PA, Plinkert PK. (2006). Polydimethylsiloxane particles for permanent injection laryngoplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115, 103-109.
- Sittel C, Plinkert PK. (2005). Stimmlippenaugmentation. *HNO* 53, 6-10.
- Sittel C. (2004). Polydimethylsiloxane particles are not experimental in the human larynx. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 69, 251.
- Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 7, 22.
- Solchaga LA, Temenoff JS, Gao J, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM. (2005). Repair of osteochondral defects with hyaluronan- and polyester-based scaffolds. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 297-309.
- Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S. (1998). Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* 17, 598-608.

- Spector M. (2001). Musculoskeletal connective tissue cells with muscle: expression of muscle actin in and contraction of fibroblasts, chondrocytes, and osteoblasts. *Wound Repair Regen* 9, 11-18.
- Stark Y, Suck K, Kasper C, Wieland M, van Griensven M, Scheper T. (2006). Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Exp Toxicol Pathol* 57, 305-311.
- Steurer M, Passler C, Denk DM, Schneider B, Niederle B, Bigenzahn W. (2002). Advantages of recurrent laryngeal nerve identification in thyroidectomy and parathyroidectomy and the importance of preoperative and postoperative laryngoscopic examination in more than 1000 nerves at risk. *Laryngoscope* 112, 124-133.
- Steward AJ, Thorpe SD, Vinardell T, Buckley CT, Wagner DR, Kelly DJ. (2012). Cell-matrix interactions regulate mesenchymal stem cell response to hydrostatic pressure. *Acta Biomater* 8, 2153-2159.
- Stokols S, Sakamoto J, Breckon C, Holt T, Weiss J, Tuszynski MH. (2006). Templated agarose scaffolds support linear axonal regeneration. *Tissue Eng* 12, 2777-2787.
- Strehin IA, Elisseeff JH. (2009). Characterizing ECM production by cells encapsulated in hydrogels. *Methods Mol Biol* 522, 349-362.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54, 132-141.
- Stroh A, Faber C, Neuberger T, Lorenz P, Sieland K, Jakob PM, Webb A, Pilgrim H, Schober R, Pohl EE, Zimmer C. (2005). In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6 T) magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 24, 635-645.
- Stroh A, Zimmer C, Gutzeit C, Jakstadt M, Marschinke F, Jung T, Pilgrim H, Grune T. (2004). Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. *Free Radic Biol Med* 36, 976-984.
- Stroh A, Zimmer C, Werner N, Gertz K, Weir K, Kronenberg G, Steinbrink J, Mueller S, Sieland K, Dirnagl U, Nickenig G, Endres M. (2006). Tracking of systemically administered mononuclear cells in the ischemic brain by high-field magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 33, 886-897.
- Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, Yetman R, Eliachar I, Mayes J. (2001). Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N Engl J Med* 344, 1676-1679.
- Strome M. (2000). Human laryngeal transplantation: considerations and implications. *Microsurgery* 20, 372-374.
- Sung HM, Suh IS, Lee HB, Tak KS, Moon KM, Jung MS. (2012). Case reports of adipose-derived stem cell therapy for nasal skin necrosis after filler injection. *Arch Plast Surg* 39, 51-54.
- Suzuki Y, Zhang S, Kundu P, Yeung AC, Robbins RC, Yang PC. (2007). In vitro comparison of the biological effects of three transfection methods for magnetically labeling mouse embryonic stem cells with ferumoxides. *Magn Reson Med* 57, 1173-1179.
- Takano S, Nito T, Tamaruya N, Kimura M, Tayama N. (2012). Single institutional analysis of trends over 45 years in etiology of vocal fold paralysis. *Auris Nasus Larynx* 39, 597-600.
- Tan H, Chu CR, Payne K, Marra KG. (2009). Injectable In situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 30, 2499-2506.
- Tan H, Marra KG. (2010). Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Materials* 3, 1746-1767.
- Tang S, Spector M. (2007). Incorporation of hyaluronic acid into collagen scaffolds for the control of chondrocyte-mediated contraction and chondrogenesis. *Biomed Mater* 2, 135-141.

- Tapp H, Hanley EN, Patt JC, Gruber HE. (2009). Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med* 234, 1-9.
- Taupitz M, Schnorr J, Abramjuk C, Wagner S, Pilgrimm H, Hünigen H, Hamm B. (2000). New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: preclinical results in rats and rabbits. *J Magn Reson Imaging* 12, 905-911.
- Technau A, Froelich K, Hagen R, Kleinsasser N. (2011). Adipose tissue-derived stem cells show both immunogenic and immunosuppressive properties after chondrogenic differentiation. *Cytotherapy* 13, 310-317.
- ten Koppel PG, van Osch GJ, Verwoerd CD, Verwoerd-Verhoef HL. (2001). A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the 'rabbit pinna punch-hole' model. *Biomaterials* 22, 1407-1414.
- Tew S, Kwan APL, Hann A, Thomson B, Archer CW. (2000). The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis. *Arthritis Rheum* 43, 215-225.
- Thorek DL, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A. (2006). Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Probes for Molecular Imaging. *Ann Biomed Eng* 34, 23-38.
- Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma H, Ma PX, Atala A, Zhang Y. (2010). Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *Biomaterials* 31, 870-877.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Tintinago LF, Cano F, López B, White A, Casas C, Gaviria E, Martínez F. (2004). Transplantes de laringe y tráquea, una opción para el presente y el futuro. *IATREIA* 17, 62-67.
- Toh WS, Lim TC, Kurisawa M, Spector M. (2012). Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials* 33, 3835-3845.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS. (2003). Transforming growth factor- β -mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 278, 41227-41236.
- Ulrich TA, Jain A, Tanner K, MacKay JL, Kumar S. (2010). Probing cellular mechanobiology in three-dimensional culture with collagen-agarose matrices. *Biomaterials* 31, 1875-1884.
- van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24, 131-139.
- Van RLR, Roncari DAK. (1977). Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue. *Cell Tissue Res* 181, 197-203.
- Varghese S, Elisseeff JH. (2006). Hydrogels for musculoskeletal tissue engineering. *Adv Polym Sci* 203, 95-144.
- Varghese S, Hwang NS, Canver AC, Theprungsirikul P, Lin DW, Elisseeff J. (2008). Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biology* 27, 12-21.
- Vater C, Kasten P, Stiehler M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 7, 463-477.
- Weiseh O, Sun C, Gunn J, Kohler N, Gabikian P, Lee D, Bhattarai N, Ellenbogen R, Sze R, Hallahan A, Olson J, Zhang M. (2005). Optical and MRI multifunctional nanoprobe for targeting gliomas. *Nano Lett* 5, 1003-1008.

- Vinardell T, Thorpe SD, Buckley CT, Kelly DJ. (2009). Chondrogenesis and integration of mesenchymal stem cells within an in vitro cartilage defect repair model. *Ann Biomed Eng* 37, 2556-2565.
- Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 27, 307-314.
- Voigt-Zimmermann S, Arens C. (2013). Behandlung von Glottisschlussinsuffizienzen. *HNO* 61, 117-134.
- Wagner S, Schnorr J, Pilgrimm H, Hamm B, Taupitz M. (2002). Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging: preclinical in vivo characterization. *Invest Radiol* 37, 167-177.
- Wahajuddin, Arora S. (2012). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine* 7, 3445-3471.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18, 1417-1426.
- Walczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, Lin S, Bulte JW. (2005). Instant MR labeling of stem cells using magnetoelectroporation. *Magn Reson Med* 54, 769-774.
- Wang L, Tran I, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. (2009). A comparison of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng A* 15, 2259-2266.
- Wang Y, Kim UJ, Blasioli DJ, Kim HJ, Kaplan DL. (2005). In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26, 7082-7094.
- Weiss S, Hennig T, Bock R, Steck E, Richter W. (2010). Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Phys* 223, 84-93.
- Weizenecker J, Borgert J, Gleich B. (2007). A simulation study on the resolution and sensitivity of magnetic particle imaging. *Phys Med Biol* 52, 6363-6374.
- Westreich R, Kaufman M, Gannon P, Lawson W. (2004). Validating the subcutaneous model of injectable autologous cartilage using a fibrin glue scaffold. *Laryngoscope* 114, 2154-2160.
- Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. (2003). Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 412, 196-212.
- Williams CG, Kim TK, Taboas A, Malik A, Manson P, Elisseeff J. (2003). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel. *Tissue Eng* 9, 679-688.
- Wilson A, Butler PE, Seifalian AM. (2011). Adipose-derived stem cells for clinical applications: a review. *Cell Prolif* 44, 86-98.
- Winkler T, von Roth P, Schuman MR, Sieland K, Stoltenburg-Didinger G, Taupitz M, Perka C, Duda GN, Matziolis G. (2008). In vivo visualization of locally transplanted mesenchymal stem cells in the severely injured muscle in rats. *Tissue Eng A* 14, 1149-1160.
- Woodfield TB, Malda J, De Wijn J, Peters F, Riesle J, van Blitterswijk CA. (2004). Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials* 25, 4149-4161.
- Wu X, Tan Y, Mao H, Zhang M. (2010). Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *Int J Nanomedicine* 5, 385-399.
- Wu YL, Ye Q, Foley LM, Hitchens TK, Sato K, Williams JB, Ho C. (2006). In situ labeling of immune cells with iron oxide particles: An approach to detect organ rejection by cellular MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1852-1857.

- Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Bohmer D, Henkel T, Kahmann F, Sehouli J, Felix R, Ricke J, Jordan A. (2006). Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy-feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperthermia* 22, 673-685.
- Xie H, Zhu Y, Jiang W, Zhou Q, Yang H, Gu N, Zhang Y, Xu H, Xu H, Yang X. (2011). Lactoferrin-conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a specific MRI contrast agent for detection of brain glioma in vivo. *Biomaterials* 32, 495-502.
- Xu W, Hu R, Fan E, Han D. (2011). Adipose-derived mesenchymal stem cells in collagen-hyaluronic acid gel composite scaffolds for vocal fold regeneration. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 120, 123.
- Yan H, Yu C. (2007). Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy* 23, 178-187.
- Yates KE, Allemann F, Glowacki J. (2005). Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes. *Cell Tissue Bank* 6, 45-54.
- Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 327, 449-462.
- Yoshimura K, Asano Y, Aoi N, Kurita M, Oshima Y, Sato K, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Harii K. (2010). Progenitor-enriched adipose tissue transplantation as rescue for breast implant complications. *Breast J* 16, 169-175.
- Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. (2008). Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg* 32, 48-55.
- Zhang LM, Wu CX, Huang JY, Peng XH, Chen P, Tang SQ. (2012). Synthesis and characterization of a degradable composite agarose/HA hydrogel. *Carbohydr Polym* 88, 1445-1452.
- Zhang P, Jimenez SA, Stokes DG. (2003). Regulation of human COL9A1 gene expression. Activation of the proximal promoter region by SOX9. *J Biol Chem* 278, 117-123.
- Zhang Y, Daquinag A, Traktuev DO, Amaya-Manzanares F, Simmons PJ, March KL, Pasqualini R, Arap W, Kolonin MG. (2009). White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models. *Cancer Res* 69, 5259-5266.
- Zhao Q, Langley J, Lee S, Liu W. (2011). Positive contrast technique for the detection and quantification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in MRI. *NMR Biomed* 24, 464-472.
- Zheng L, Fan HS, Sun J, Chen XN, Wang G, Zhang L, Fan YJ, Zhang XD. (2010). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based hydrogel: An in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 93, 783-792.
- Zheng L, Sun J, Chen X, Wang G, Jiang B, Fan H, Zhang X. (2009). In vivo cartilage engineering with collagen hydrogel and allogeneous chondrocytes after diffusion chamber implantation in immunocompetent host. *Tissue Eng A* 15, 2145-2153.
- Zhou B, Shan H, Li D, Jiang ZB, Qian JS, Zhu KS, Huang MS, Meng XC. (2010). MR tracking of magnetically labeled mesenchymal stem cells in rats with liver fibrosis. *Magn Res Imaging* 28, 394-399.
- Zhou J, Zhou M, Caruso RA. (2006). Agarose template for the fabrication of macroporous metal oxide structures. *Langmuir* 22, 3332-3336.
- Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. (2013). Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *J Vis Exp* 79, e50585.
- Zhu YK, Umino T, Liu XD, Wang HJ, Romberger DJ, Spurzem JR, Rennard SI. (2001). Contraction of fibroblast-containing collagen gels: initial collagen concentration regulates the degree of contraction and cell survival. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37, 10-16.

- Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, Basse P, Landreneau RJ, Donnenberg VS. (2011). Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Eng A* 17, 93-106.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.

7.3 Kongressbeiträge aus der vorliegenden Arbeit

- Ramos Tirado M.** Stammzellbasierte Behandlungsstrategien zur Stimmlippenaugmentation und laryngealen Defektrekonstruktion. *IZKF Projektleiterseminar 2011, Kloster Banz, 20. u. 21. Mai (2011).*
- Ramos Tirado M,** Technau A, Frölich K, Kleinsasser NH. Optimierung der chondrogenen Differenzierung von adipose tissue derived stem cells (ADSC) in Kollagengelen. *82. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V, Freiburg i. Br., 1. - 5. Juni (2011).*
- Ramos Tirado M.** Füllmaterialien zur Stimmlippenaugmentation in der Laryngologie. *Wissenschaftliches Symposium zu Ehren des 75. Geburtstages von Herrn Univ.-Prof. em. Dr. med. Dr. h. c. J. Helms, Würzburg, 3. März (2012).*
- Ramos Tirado M,** Frölich K, Technau A, Kleinsasser NH. Einfluss superparamagnetischer Eisenoxidnanopartikel (VSOP) auf Differenzierung, Proliferation, Vitalität und genetische Stabilität von mesenchymalen Stammzellen. *83. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., Mainz, 16. - 20. Mai (2012).*
- Frölich K, **Ramos Tirado M,** Kleinsasser N. Tissue Engineering in Laryngology. *Strategies in Tissue Engineering, Würzburger Initiative Tissue Engineering e. V., Würzburg, 23. - 25. Mai (2012).*
- Kleinsasser N, Frölich K, Burghartz M, Hackenberg S, **Ramos Tirado M,** Technau A. Applications of Tissue Engineering in Otorhinolaryngology - Reconstructive Head and Neck Surgery. *Strategies in Tissue Engineering, Würzburger Initiative Tissue Engineering e. V., Würzburg, 23. - 25. Mai (2012).*
- Kleinsasser N, Technau A, **Ramos Tirado M,** Frölich K. Aktuelle Konzepte des Tissue Engineerings für die funktionale Laryngologie. *56. Österreichischer HNO Kongress der Österreichischen Gesellschaft für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, St. Pölten, Österreich, 12. - 15. September (2012).*
- Ramos Tirado M,** Frölich K, Technau A, Kleinsasser NH. Chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen mit unterschiedlichen Hydrogelkombinationen und Wachstumsfaktoren. *84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., Nürnberg, 08. - 12. Mai (2013).*
- Frölich K, **Ramos Tirado M,** Hagen R, Kleinsasser NH. Einfluss von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln (VSOP) auf Vitalität, Struktur sowie Differenzierungspotential von humanen Fettstammzellen und Effizienz der Markierung im Langzeitversuch. *84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., Nürnberg, 08. - 12. Mai (2013).*

7.4 Curriculum Vitae

Persönliche Daten:	
Name:	Ramos Tirado
Vorname:	Mario
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Studium:	
Abschluss:	Diplom-Ingenieur (FH) in Biotechnologie
Studiengang Biotechnologie:	Oktober 2001 - August 2009: Fachhochschule Bingen, Bingen am Rhein
	September 1999 - Mai 2001: Universität San Francisco de Quito, Quito - Ecuador
Studiengang Humanmedizin:	September 1997 - August 1999: Universität San Francisco de Quito, Quito - Ecuador

Schulbildung:	
Schulabschlüsse:	Allgemeine Hochschulreife (Abitur) Bachillerato (ecuadorianisches Abitur)
Gymnasium:	Oktober 1989 - Mai 1997: Colegio Alemán Quito (Deutsche Schule Quito), Quito - Ecuador (6.- 13. Klasse)
	August 1987 - Juli 1989: Hohe Landesschule, Hanau (5. Klasse)
Grundschule:	August 1983 - Juni 1987: Theodor-Heuss-Schule, Hanau (1. - 4. Klasse)

Praktische Erfahrungen:	
Diplomarbeit:	Dezember 2008 - August 2009: Labor für Gentechnik und Proteomik der Firma GenXPro GmbH am Frankfurter Innovationszentrum für Biotechnologie (FIZ) - Frankfurt am Main. Experimentelle Arbeiten zur Erstellung der Diplomarbeit zum Thema „Herstellung und Evaluierung von Sonden zur Analyse der Expression spezifischer Gene bei der Samenentwicklung der Olive (<i>Olea europaea</i>)“. Abschlussnote: 1,3
Praxissemester:	Oktober 2006 - März 2007: Labor für Pädiatrische Immunologie des Klinikums der Johannes Gutenberg Universität Mainz. Experimentelle Arbeit zum Thema: „Expressionsanalysen spezifischer Gene von humanen dendritischen Zellen (neonatal und adult) mittels qRT-PCR“.
Studienvorpraktikum:	Mai - August 2000: Labor für Mikrobiologie der Firma Chemie Ariston Ecuador GmbH, Quito - Ecuador. Allgemeine Labortätigkeiten, mikrobiologische Qualitätskontrolle unter GMP-Bedingungen von Rohstoffen zur Herstellung pharmazeutischer und kosmetischer Produkte.

7.5 Danksagung

An dieser Stelle danke ich all denjenigen Menschen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen für das Ermöglichen dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Universität Würzburg.
- meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA, für die Vergabe eines interessanten und aktuellen Themas sowie für die engagierte wissenschaftliche Betreuung.
- meiner Betreuerin, Frau PD Dr. med. Katrin Frölich für die fachkundige und hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.
- Herrn PD Dr. Robert Hock am Biozentrum der Universität Würzburg für die Übernahme der internen Betreuung und die fachliche Beratung.
- dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung Würzburg (IZKF) für die Bewilligung und Finanzierung dieses Forschungsprojekts.
- den Mitarbeitern des HNO-Labors der Arbeitsgruppe Tissue Engineering der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Universität Würzburg Frau Dr. rer. nat. Antje Technau, Frau Petra Joa, Frau Renate Port, Frau Silke Hummel, Herrn Michael Kessler, Frau Margarete Appelman und Frau Karin Jung für die fachliche und technische Unterstützung sowie für die Motivation und das sehr angenehme Arbeitsklima.
- den Operateuren und ihren Teams der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen) und der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische und Wiederherstellungschirurgie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Meffert) der Universität Würzburg für die Bereitstellung von Nasenseptumknorpel bzw. Fettgewebe.

- Herrn Univ.-Prof. Dr. Georg Krohne, Frau Daniela Bunsen und Frau Claudia Gehrig am Biozentrum der Universität Würzburg für die Probenvorbereitung für die Transmissionselektronenmikroskopie und die nachträgliche Filmentwicklung.
- Herrn Dr. Daniel Haddad am MRB Forschungszentrum für Magnet-Resonanz-Bayern e.V. sowie Herrn Dipl.-Phys. Joachim Schrauth und Frau Dipl.-Phys. Kathrin Hemberger am Lehrstuhl für Experimentelle Physik der Universität Würzburg für die magnetresonanztomographischen Messungen.
- Frau Univ.-Prof. Dr. Helga Stopper, Herrn Dr. Gholamreza Fazeli und Frau Maria Scheurich am Lehrstuhl für Toxikologie der Universität Würzburg für die Bereitstellung des Photometers.
- Frau Dipl.-Math. Sabine Karl am Lehrstuhl für Mathematik VIII-Statistik der Universität Würzburg für die kompetente statistische Beratung.
- meinen Eltern und meiner Ehefrau für ihre vielseitige Unterstützung und Motivation während der Durchführung dieser Arbeit sowie denjenigen Familienangehörigen und Freunden, die stets Interesse an meiner Arbeit zeigten.

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner bestätige ich, dass ich weder an der Universität Würzburg noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung abzulegen.

Würzburg, den 11.06.2015

Mario Ramos Tirado