

Aus der orthopädischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

# **Genetische Modifikation humaner mesenchymaler Stammzellen zur Stimulation der Knochenheilung**



Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Jonas Georg Schmalzl  
aus  
Würzburg

Würzburg, Juli 2016



**Referent:** Prof. Dr. med. Ulrich Nöth

**Koreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Albrecht Müller

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

**Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2016**

**Der Promovend ist Arzt**

Meiner Familie gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Segmentale Knochendefekte - eine klinische Herausforderung	1
1.2	Tissue Engineering . . . . .	2
1.3	Das Knochengewebe und die Osteogenese . . . . .	3
1.3.1	Mesenchymale Stammzellen: Grundlage der Knochenregeneration . . . . .	4
1.3.2	Die Rolle von BMP und IHH bei der Knochenbildung . . . . .	5
1.3.2.1	Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) . . . . .	5
1.3.2.2	Indian Hedgehog (IHH) . . . . .	6
1.4	Fragestellung . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Material . . . . .	8
2.2	Methoden . . . . .	11
2.2.1	Zellkultur . . . . .	11
2.2.1.1	Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark . . . . .	11
2.2.1.2	Herstellung rekombinanter adenoviraler Vektoren . . . . .	12
2.2.1.3	Adenovirale Transduktion und Bestimmung der Transgenexpression . . . . .	13
2.2.2	Analyse der metabolischen Aktivität und des Proliferationsverhaltens . . . . .	13
2.2.2.1	Metabolische Aktivität . . . . .	13
2.2.2.2	Zellproliferationsassay . . . . .	13
2.2.3	Methoden zum Nachweis der osteogenen Differenzierung . . . . .	14
2.2.3.1	Nachweis der alkalische Leukozytenphosphatase-Aktivität . . . . .	14
2.2.3.2	Nachweis von Kalzium . . . . .	14
2.2.3.3	Alizarinrot S-Färbung . . . . .	15

2.2.4	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion . . . . .	16
2.2.4.1	RNA-Isolierung . . . . .	16
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung der RNA . . . . .	16
2.2.4.3	DNA-Synthese . . . . .	17
2.2.4.4	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion . . . . .	17
2.2.4.5	Primer . . . . .	19
2.2.5	Statistische Datenanalyse . . . . .	20
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1	Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen . .	21
3.1.1	Analyse des Wachstumsverhaltens transfizierter und nicht transfizierter humaner mesenchymaler Stammzellen . . . . .	21
3.1.1.1	Metabolische Aktivität . . . . .	22
3.1.1.2	Proliferationsverhalten . . . . .	22
3.1.2	Transgenexpression . . . . .	24
3.2	Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stamm- zellen in Monolayerkultur . . . . .	24
3.2.1	Histochemische Analyse . . . . .	26
3.2.1.1	Alkalische Leukozytenphosphatase-Aktivität . . . . .	26
3.2.1.2	Histologie . . . . .	27
3.2.2	Genanalyse mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase Ket- ten Reaktion . . . . .	29
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>33</b>
4.1	Grundlagen . . . . .	33
4.2	Synergismus von BMP-2 und IHH . . . . .	34
4.3	Expression osteogener Markergene . . . . .	35
4.4	Verwendung adenoviraler Vektoren zur Überexpression der Wachstumsfaktoren . . . . .	36
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>39</b>

# Abbildungsverzeichnis

- 1 Die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen über Osteoprogenitorzellen zum knochenbildenden Osteoblasten. . . . .
- 2 Mononukleäre, humane mesenchymale Stammzellen nach 2 (A) und 12 Tagen (B) in Zellkultur. Vergrößerung 40x. . . . .
- 3 Metabolische Aktivität nativer (Ctrl) und transduzierter (BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP-2) humaner mesenchymaler Stammzellen. . . . .
- 4 Proliferationsverhalten nativer (Ctrl) und transduzierter (BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP-2) humaner mesenchymaler Stammzellen. . . . .
- 5 Zellmonolayerkulturen 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach viraler Transfektion. Darstellung von BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP2 exprimierenden Zellgruppen und nativen hMSZ, kultiviert in Standardmedium. Vergrößerung 40x. . . . .
- 6 Transgenexpression von BMP-2 (a) und IHH (b). . . . .
- 7 Native Zellmonolayerkulturen an den Tagen 14 und 28 von BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP2 exprimierenden Zellgruppen und nativen hMSZ, kultiviert in osteogenem sowie in Kontrollmedium. Vergrößerung 40x. . . . .
- 8 Alkalische Leukozytenphosphatase-Aktivität osteogen differenzierter Gruppen (a) und undifferenzierter Kontrollgruppen (b). . . . .
- 9 Quantifizierung der Alizarinrot-Färbung für osteogen differenzierte Gruppen (a) sowie undifferenzierte Kontrollgruppen (b). . . . .
- 10 Zellmonolayerkulturen nach Alizarinrot-Färbung an den Tagen 14 und 28 von BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP2 exprimierenden Zellgruppen und nativen hMSZ, kultiviert in osteogenem sowie in Kontrollmedium. Vergrößerung 40x.
- 11 Genexpression der alkalischen Leukozytenphosphatase (ALP) in den osteogen differenzierten Gruppen (a) und in den undifferenzierten Kontrollgruppen (b) im zeitlichen Verlauf. . . . .
- 12 Genexpression von Osteopontin (OP) in den osteogen differenzierten Gruppen (a) und in den undifferenzierten Kontrollgruppen (b) im zeitlichen Verlauf.

13 Genexpression von Osteocalcin (OC) in den osteogen differenzierten Gruppen (a) und in den undifferenzierten Kontrollgruppen (b) im zeitlichen Verlauf. .

14 Genexpression von Runt-related transcription factor 2 (Runx2) in den osteogen differenzierten Gruppen (a) und in den undifferenzierten Kontrollgruppen (b) im zeitlichen Verlauf. . . . .

# Tabellenverzeichnis

1	Bedingungen für die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion . . . .
2	Liste der verwendeten Primer . . . . .

# Abkürzungsverzeichnis

**Ad** Adenovirus

**AGN** Aggrecan

**ALP** alkalische Leukozytenphosphatase

**Aq. dest.** Aqua destilata

**Aq. bidest.** Aqua bidestilata

**BMPs** Bone Morphogenetic Proteins

**BMP-2** Bone Morphogenetic Protein-2

**BSP** Bone Sialoprotein

**cDNA** komplementäre Desoxyribonukleinsäure

**Col** Kollagen

**CO<sub>2</sub>** Kohlenstoffdioxid

**DNA** Desoxyribonukleinsäure

**dNTPs** Desoxyribonukleosidtriphosphate

**DMEM/HAM'S F-12** Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit HAM'S F-12

**DMEM High Glucose** Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose

**ELISA** Enzyme-linked Immunosorbent Assay

**FCS** fötales Kälberserum

**GAG** Glykosaminoglykan

**GFP** Grün-fluoreszierendes Protein

**HH** Hedgehog

**H<sub>2</sub>O** Wasser

**HPLC-H<sub>2</sub>O** Wasser für Hochdruckflüssigchromatographie

**hMSZ** humane mesenchymale Stammzellen

**IHH** Indian Hedgehog

**IP** infectious viral particles

**mRNA** Boten-Ribonukleinsäure

**O<sub>2</sub>** Sauerstoff

**OC** Osteocalcin

**OD** optische Dichte

**ODM** osteogenes Differenzierungsmedium

**ON** Osteonektin

**OP** Osteopontin

**OSE2** Osteoblast-Specific cis-Activating Element

**PBE** Phosphate Buffered EDTA

**PBS** Phosphat-gepufferte Salzlösung

**p-NPP** para-Nitrophenylphosphat

**PTHrP** Parathormon-related Protein

**qRT-PCR** quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

**RNA** Ribonukleinsäure

**Runx2** Runt-related transcription factor 2

**SHH** Sonic Hedgehog

**SM** Standardmedium

**SZM** Stammzellkulturmedium

**TEP** Totalendoprothese

**TGF** Transforming Growth Factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Segmentale Knochendefekte - eine klinische Herausforderung

Eine Vielzahl verschiedener Pathomechanismen kann zur Entstehung segmentaler Knochendefekte führen. Dazu zählen unter anderem infektbedingte Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise eine chronische Osteomyelitis, Traumata, aber auch neoplasiebedingte chirurgische Knochenresektionen. Ein Knochendefekt kritischer Größe ist definiert als ein orthotoper ossärer Defekt, der ohne Intervention nicht selbstständig heilt [1]. Für die ausbleibende Heilung können verschiedene Faktoren, wie beispielsweise Instabilität, mangelnde Durchblutung, Infekt oder Überbelastung, ursächlich sein. Als Goldstandard für die Therapie von Knochendefekten kritischer Größe gilt die autologe Knochentransplantation. Typische Entnahmestellen hierfür sind der vordere Beckenkamm, die Fibula oder die Rippen. Die Verwendung autologen Gewebes ist jedoch mit limitierenden Faktoren, wie einer begrenzten Verfügbarkeit von Transplantatmaterial, Entnahmemorbidität und häufig unzureichender Transplantatintegration, behaftet. Weitere therapeutische Optionen für besonders ausgedehnte segmentale Knochendefekte stellen der Segmenttransport mittels Ringfixateur sowie die membraninduzierte Osteogenese mit der Masquelet Technik dar. Allerdings zeigen die zur Verfügung stehenden therapeutischen Maßnahmen zur Rekonstruktion dieser Knochendefekte trotz stetiger Weiterentwicklung teilweise nur unzureichende klinische Ergebnisse.

Benigne Knochentumore werden in der Regel zunächst kürettiert. Anschließend wird der entstandene Defekt mit autologem, spongiösem Knochen oder einem synthetischen Knochenersatzmaterial aufgefüllt. Im Falle von malignen Tumoren erfolgt nach kompletter Resektion des tumorösen Gewebes in der Regel die Implantation einer Tumorendoprothese, der - abhängig von der Sensibilität des jeweiligen Tumors - eine Chemotherapie oder Radiatio angeschlossen werden kann. Zu den Therapieoptionen der chronischen Osteomyelitis zählt unter anderem die Ausräumung des infizierten Gewebes mit anschließender Einbringung von resorbierbaren Antibiotikaträgern.

Elementare Voraussetzungen für eine zufriedenstellende Knochenheilung nach stattgehabter Fraktur sind zum einen die Ruhigstellung des betroffenen Körperteils und zum anderen die Gewährleistung einer suffizienten Durchblutung des betroffenen Areals. Werden diese Anforderungen nicht erfüllt, kann es zu einem verzögerten Heilungsprozess oder zur Ausbildung einer Pseudarthrose kommen. Definitionsgemäß spricht man von einer Pseudarthrose, wenn nach sechs Monaten keine knöcherne Heilung der Fraktur erfolgt ist [2].

## 1.2 Tissue Engineering

Für viele der erwähnten Verletzungen bzw. Erkrankungen existieren bis heute keine adäquaten Behandlungsmöglichkeiten. Das innovative Forschungsgebiet des Tissue Engineering eröffnet in diesem Zusammenhang neue Möglichkeiten. So bergen die neuen Therapieansätze im Bereich der regenerativen Medizin ein großes Potential für die Behandlung von Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems [3, 4] und speziell des menschlichen Knochens [5].

### *Definition:*

Tissue Engineering ist ein Ende der achtziger Jahre entwickeltes und von Langer und Vacanti erstmals vorgestelltes, interdisziplinäres Forschungskonzept, das die Prinzipien und Methoden sowohl der Ingenieurwissenschaften als auch der Lebenswissenschaften dahingehend vereint, Möglichkeiten zu erschließen, die Funktion verschiedenster Gewebe wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern.

Das Konzept des Tissue Engineering basiert auf den drei folgenden Grundstrategien der Geweberekonstruktion:

1. Dem Einsatz von Zellen, die das zu regenerierende Gewebe infiltrieren und ersetzen sollen.
2. Dem Einsatz von Zell-Trägermaterialien (Scaffolds).
3. Dem Einsatz von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren, Biomolekülen oder anderer Stimuli, wie beispielsweise mechanischer Reize.

## 1.3 Das Knochengewebe und die Osteogenese

Das Knochengewebe zählt zum Binde- und Stützgewebe des menschlichen Körpers. Es besteht zum Großteil aus mineralisierter, extrazellulärer Matrix, die sich hauptsächlich aus Hydroxylapatit sowie aus Kollagen 1-Fibrillen zusammensetzt. Neben seiner Stützfunktion dient Knochengewebe als ein Reservoir für Kalzium und Phosphat und spielt zudem eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Daher erfüllt das Knochengewebe zahlreiche Funktionen und unterliegt zudem einem ständigen Umbauprozess. Der Knochenumbau wird einerseits durch mechanische Beanspruchung stimuliert und andererseits durch verschiedene para- und endokrine Mechanismen reguliert. Neben knochenbildenden Osteoblasten, knochenresorbierenden Osteoklasten und in der Matrix eingeschlossenen Osteozyten wirken auch einige Zelltypen aus dem Knochenmark bei den Umbauprozessen mit. Dazu zählen beispielsweise Lymphozyten und Erythrozyten [6].

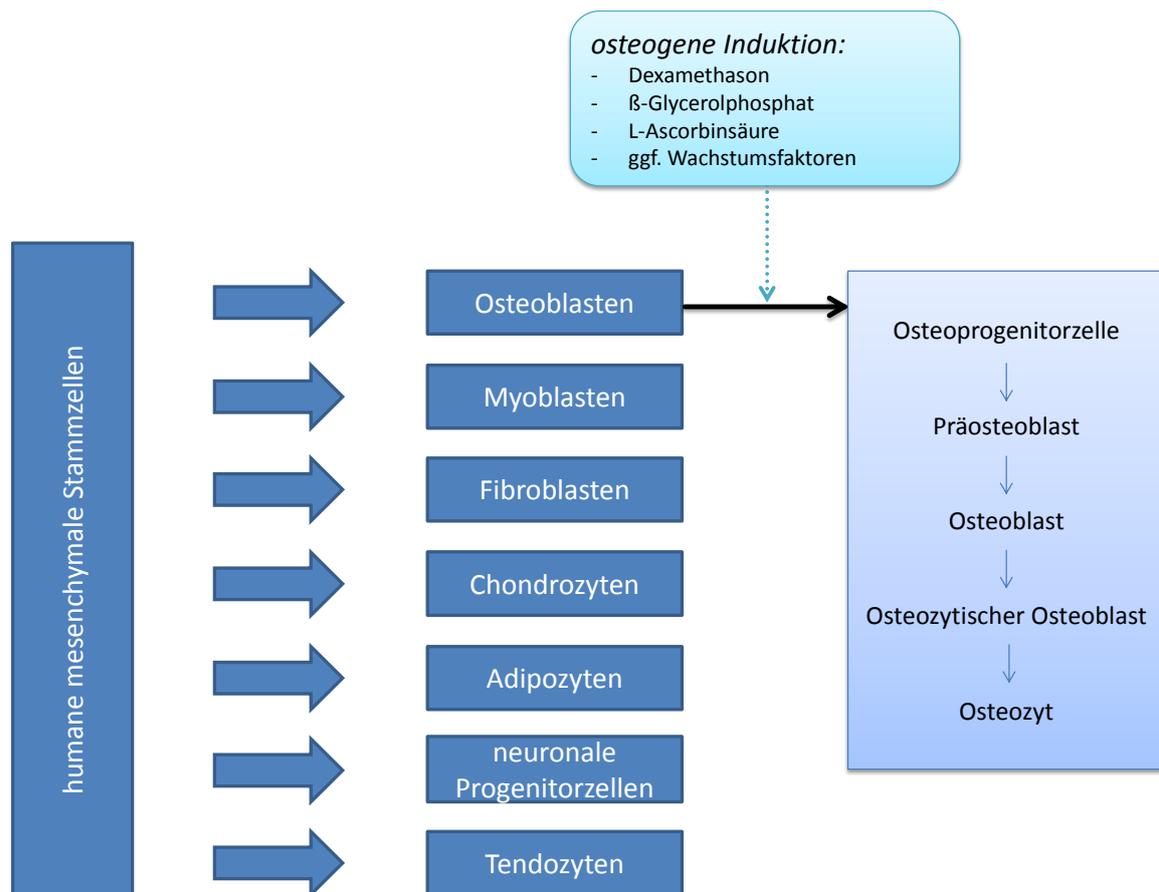
Die Knochenentwicklung erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen, der desmalen- und der (en)chondralen Ossifikation. Durch die desmale Ossifikation werden unter anderem die Schädelknochen ausgebildet. Die desmale Knochenneubildung beginnt mit der Aggregation und Kondensation mesenchymaler Stammzellen, die dann direkt zu Knochenmatrix produzierenden Osteoblasten differenzieren. Die (en)chondrale Ossifikation, welche größtenteils für die Genese des axialen Skelettsystems verantwortlich ist, ist gekennzeichnet durch die Ausbildung eines knorpeligen Primordialskeletts, welches im Rahmen der Osteogenese zunächst durch Osteoklasten resorbiert und anschließend von Osteoblasten durch Knochenmatrix ersetzt wird.

Vereinfacht lässt sich die osteogene Entwicklung von der Stammzelle bis zum Osteozyten in die Zellstadien mesenchymale Stammzelle, Osteoprogenitorzelle, Präosteoblast, Osteoblast, osteozytischer Osteoblast und Osteozyt unterteilen. Die ersten drei Zelltypen zeichnen sich durch eine hohe Zellteilungsaktivität aus. Osteoblasten hingegen teilen sich nicht mehr und produzieren alle für die Knochenbildung notwendigen Matrixkomponenten, wie beispielsweise Kollagen I, Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin oder Bone Sialoprotein. Etwa 10-20% der Osteoblasten werden in Osteozyten umgewandelt. Außerdem entwickeln sich so genannte Lining-Zellen, die endostalen Belegzellen entsprechen. Die meisten Osteoblasten (65%) unterliegen nach der Erfüllung ihrer Aufgabe, das heißt der Sezernierung der Knochenmatrix und der Bildung eines stabilen Lamellenknochens, der Apoptose [7].

### 1.3.1 Mesenchymale Stammzellen: Grundlage der Knochenregeneration

Die Forschung im Bereich der Knochenregeneration hat sich in den letzten Jahren auf die Anwendung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSZ) konzentriert, da diese in der Lage sind, zu Osteoblasten zu differenzieren [8]. Stammzellen des adulten Organismus dienen dazu, kontinuierlich reife, funktionstüchtige Zellen für Gewebeumbau und Geweberegeneration zur Verfügung zu stellen, um die Funktion des Organismus zu gewährleisten. HMSZ sind adulte, multipotente Stammzellen, die nicht nur aus dem Knochenmark, sondern unter anderem auch aus Nabelschnurblut, Bindegewebe, Fettgewebe, synovialer Flüssigkeit, Plazenta und Zähnen isoliert werden können [9]. Anders als embryonale, das heißt pluripotente Stammzellen, können humane mesenchymale Stammzellen (hMSZ) nur in eine begrenzte Anzahl an Zelltypen differenzieren: Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Tendozyten, Fibroblasten, Myoblasten und neuronale Vorläuferzellen [10,11]. Die Differenzierung wird mitunter durch spezifische Wachstumsfaktoren, bestimmte Signalwege und Transkriptionsfaktoren reguliert. *In vitro* konnte bisher die osteogene, adipogene, chondrogene, tendogene, myogene und neurogene Differenzierung von hMSZ induziert werden [11,12].

HMSZ stellen eine vielversprechende Ressource für zellbasierte Therapieansätze dar, da sie multipotent und zudem relativ einfach zu isolieren, zu expandieren und zu kultivieren sind. Obwohl regenerative Verfahren in Gebieten wie der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bereits erfolgreich Einzug gehalten haben [8,13], konnten prinzipiell vielversprechende Ansätze und Ergebnisse aus *in vitro* Studien und Tierversuchen [14] nicht ohne Weiteres auf den menschlichen Organismus übertragen und verlässlich reproduziert werden [15].



**Abb. 1:** Die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen über Osteoprogenitorzellen zum knochenbildenden Osteoblasten.

### 1.3.2 Die Rolle von BMP und IHH bei der Knochenbildung

Eine Vielzahl von Faktoren beeinflussen das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von hMSZ und sind darüber hinaus für die Herstellung eines funktionellen Gewebe- oder Organkonstruktes hilfreich oder sogar essentiell. Die Möglichkeiten reichen von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren, die zahlreiche zelluläre Prozesse induzieren und Gewebe modellieren, bis hin zu physikalischen Stimuli wie Dehnung, Druck oder Änderung des  $O_2$ -Partialdrucks [16].

#### 1.3.2.1 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind Mitglieder der Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ -Superfamilie und wichtige, autokrine Faktoren für die Osteoblastendifferenzierung und -funktion. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass aus der Gruppe dieser

Wachstumsfaktoren die BMPs 2, 4, 5 und 7 (OP-1) die osteogene Differenzierung induzieren [17–20]. Die BMPs binden an die Transmembranrezeptoren BMPR1A, BMPR1B oder BMPR2. Die Rezeptoren werden durch die Bindung zur Dimerbildung angeregt und aktivieren die MAPK-ERK-Signaltransduktionskaskade bzw. Mitglieder der SMAD-Familie [21]. Über die Phosphorylierung von SMAD1, SMAD5 und SMAD8 werden diese Proteine in den Zellkern transloziert, bilden dort Komplexe mit SMAD4 und leiten die Transkription von Zielgenen ein [22]. BMPs führen so einerseits zu einer vermehrten Expression von TNSALP, was in einer verstärkten Mineralisierung resultiert [23]. Andererseits regen sie die Bildung der Zytokine RANKL und CSF1 an, wodurch die Osteoklastogenese eingeleitet wird. Zudem fördern sie die Expression von Osteoprotegerin, das zur Regulation der Osteoklastenbildung beiträgt [24]. Im Jahr 2002 wurde rekombinantes BMP-2 (Medtronic, USA) für die anteriore lumbale Wirbelsäulenfusion zugelassen. Die klinische Anwendung wurde 2008 auf die Behandlung posterolateraler lumbaler Pseudarthrosen sowie offener Tibiaschaftfrakturen erweitert [25].

### **1.3.2.2 Indian Hedgehog (IHH)**

Auch IHH spielt eine wichtige Rolle für die Osteogenese. Nach Bindung des Hedgehog-Proteins an die membranständigen Rezeptoren Patched-1 und Smoothend erfolgt die Signaltransduktion ins Zellinnere mittels Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie, die zu den Zinkfingerproteinen zählen (Gli1, Gli2 und Gli3) [26]. Es ist bekannt, dass der Hedgehog-Signalweg bei der Skelettmorphogenese eine Rolle spielt [27]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei Mäuseembryonen, die IHH nicht exprimieren, die typische perichondrale Expression von osteogenen Markergenen wie Runx-related transcription factor 2 (Runx2), Kollagen 1 und alkalische Leukozytenphosphatase (ALP) fehlt [28]. Deshalb nimmt man an, dass der IHH-Signalweg die frühe Osteoblastogenese durch die Modulation von Runx2 beeinflusst. Außerdem reguliert IHH über die Stimulation der Parathormon-related Protein (PTHrP)-Expression die endochondrale Knochenformation [29], da PTHrP die Chondrozytendifferenzierung in der Hypertrophiezone der Knochenepiphysen verzögert.

## 1.4 Fragestellung

Die Therapie von Knochendefekten kritischer Größe, die ein kompromittiertes, intrinsisches Regenerationspotential aufweisen, stellt ein schwerwiegendes Problem dar. Die Forschung auf dem Gebiet der Knochenheilung hat sich in jüngster Vergangenheit daher auf die Anwendung von hMSZ zur Stimulation des Knochenwachstums konzentriert. Vielversprechende Ergebnisse aus *in vitro* Studien oder in Kleintiermodellen ließen sich jedoch im Menschen meist nicht reproduzieren.

In der vorliegenden Studie wurde daher in hMSZ eine Überexpression von BMP-2 und IHH induziert. BMP-2 ist ein Mitglied der TGF- $\beta$  Superfamilie und ein potenter osteogener Stimulus, der als rekombinantes Protein bereits klinische Anwendung bei der Therapie von Pseudarthrosen und bei Wirbelkörperfusionen findet [30–32]. Der Hedgehog-Signalweg spielt dagegen eine wichtige Rolle in der Skelettentwicklung und der damit verbundenen Reifung mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen [33, 34].

Das Ziel der Studie war, den Einfluss der Überexpression dieser Wachstumsfaktoren auf das osteogene Wachstumsverhalten von hMSZ *in vitro* zu untersuchen sowie deren osteogenes Potential zu steigern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Geräte

Accu-jet Pipettierer	Brand, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
AxioCam MRc	Zeiss, Jena, Deutschland
Axioskop 2	Zeiss, Jena, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank, Inkubator HERAcell 240	Heraeus, Kleinostheim, Deutschland
Consort E835 Power Supply	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Hochleistungs pH-mV-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Mikroskop	Wilovert, Heinse Ziller, Hund, Bonn, Deutschland
Mikropipetten 10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetboy	Brand, Wertheim, Deutschland

#### Verbrauchsmaterial

Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner, Essen, Deutschland
Pipettenspitzen	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Greiner, Essen, Deutschland
175cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellschaber (24 cm, 30 cm)	Biochrom, Berlin, Deutschland

6 Well-, 24 Well-, 96 Well-Platten  
Filter (0,2 mm, 0,45 mm)

0,2 mL Low Profile 8er-Strips

8er-Flat Caps Strips

Greiner, Essen, Deutschland

Satorius Stedim Biotech, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

## Chemikalien/Reagenzien

Alamarblau Lösung

Alizarinrot S

Ammoniumhydroxidlösung (10%)

$\beta$ -Mercaptoethanol

EDTA

Essigsäure (100%)

Ethanol

HPLC-Wasser

Methanol

P-Nitrophenolphosphat Lösung

Trypanblau

Trypsin

Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA

Chroma-Gesellschaft Schmidt & Co., Stuttgart, Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

AppliChem, erhalten von Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland

Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

## Kits

Kalzium O-Cresolphthalein Kit	MTI Diagnostics, Wiesbaden, Deutschland
Nucleo Spin® RNA II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
KAPA SYBR® FAST qPCR Kit	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA
ELISA Kit für IHH	Cusabio Biotech Co. Ltd, Newark, DE, USA
ELISA Kit für BMP-2	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA

## Zellkulturmedien

Alle Nährlösungen und Reagenzien für die Arbeit mit eukaryotischen Zellen wurden von Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland bezogen.

### *Stammzellkulturmedium*

500 mL	DMEM/HAM'S F-12
10%	FCS
1%	Penicillin/Streptomycin (100x)

### *Standardmedium*

500 mL	DMEM High Glucose
10%	FCS
1%	Penicillin/Streptomycin (100x)

### *Osteogenes Differenzierungsmedium*

500 mL	DMEM High Glucose
10%	FCS
1%	Penicillin/Streptomycin (100x)
50 µg/mL	Ascorbat
10mM	β-Glycerophosphat
10nM	Dexamethason

# Lösungen für Molekularbiologie und Proteinbiochemie

## *Alizarinrot S-Lösung*

50 mL	Aqua bidestilata
1%	Alizarinrot S (Alizarin sulfonsaures Natrium)
0,5%	Ammoniumhydroxid

## *Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,6*

1 L	Aqua bidestilata
1,37 M	NaCl
27 mM	KCl
0,1 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,76 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank mit sterilen Materialien und Chemikalien, sowie unter Verwendung von Latex-Handschuhen durchgeführt.

#### 2.2.1.1 Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Aus dem Femurkopf von Patienten mit Coxarthrose, die aus diesem Grund eine Hüft-Totalendoprothese (TEP) erhielten, wurden nach einem modifizierten Protokoll von Haynesworth et al. (1992) hMSZ isoliert [35]. Das schriftliche Einverständnis der Patienten wurde hierfür präoperative eingeholt. Mit Hilfe einer Kürette wurde spongiöser Knochen aus dem Femurkopf gewonnen, in 50 mL-Röhrchen überführt und mit Stammzellkulturmedium (SZM) aufgefüllt. Durch Vortexen wurden die Knochenmarkzellen aus den Spongiosatrabekeln herausgelöst. Anschließend wurde die Suspension bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Pasteurpipette

abgenommen und die Röhren mit 20 mL SZM erneut befüllt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt und die Zellen anschließend für 5 min bei 1200 U/min abzentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 20 mL SZM resuspendiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit einer Dichte von  $1 \cdot 10^9$  Zellen/175 cm<sup>2</sup> in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach drei bis vier Tagen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95%-iger Luftfeuchtigkeit wurden nicht-adhärente Zellen (Erythrozyten, Leukozyten, Plasmozyten etc.) entfernt und die adhären Zellen mit Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (1x) gewaschen. Mediumwechsel erfolgten regelmäßig alle drei bis vier Tage bis sich Kolonien von hMSZ gebildet und den Boden der 175 cm<sup>2</sup>-Flaschen zu 60-80% bedeckt hatten.

### **2.2.1.2 Herstellung rekombinanter adenoviraler Vektoren**

Die Herstellung rekombinanter adenoviraler Vektoren erfolgt in mehreren Teilschritten. Zuerst wird das auf das Adenovirus (Ad)5-Genom des viralen Vektors zu übertragende heterologe Gen (Transgen) in ein Rekombinationsplasmid eingeführt. Dort wird es von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen flankiert, die zu den nicht-kodierenden 5'-und 3'-Bereichen der Ad5-E1-Region homolog sind. Kodierende DNA-Sequenzen der frühen Gene E1a und E1b sind im Ad5-Genom deletiert, benachbarte nicht-kodierende 5'- und 3'-Bereiche sind aber noch vorhanden. Das defekte Ad5-Genom liegt dann in ein Viruspartikel oder in ein Plasmid integriert vor. Das Rekombinationsplasmid und das Ad5-DNA-flankierte Transgen werden gemeinsam mit dem defekten Ad5-Genom in eine Helferzelllinie eingeführt. Im Verlauf der viralen DNA-Replikation kommt es über die DNA-Sequenzhomologien der nicht-kodierenden E1-Regionen zur Rekombination zwischen dem Transgen und dem defekten Ad5-Genom. Es entsteht ein rekombinantes replikationsdefektes Ad5-Genom, bei dem anstelle der deletierten E1-Region jetzt das Transgen vorliegt. Die im Ad5-Genom schließlich noch vorhandenen späten Gene werden exprimiert und diese verpacken die rekombinanten Ad5-Genome zu replikationsdefekten Ad5-Viruspartikeln, die von der Helferzelllinie abgegeben werden [36].

Die in der vorliegenden Studie verwendeten Vektoren für BMP-2, Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) und IHH wurden nach dem oben geschilderten, etablierten Verfahren hergestellt [37, 38]. Die Vektoren wurden von Prof. Dr. med. A. Steinert zur Verfügung gestellt. Diese wurden mit der Bezeichnung Ad.BMP-2, Ad.IHH und Ad.GFP versehen. Zur Herstellung einer Lösung mit den rekombinanten Adenoviren wurden diese in 293 Zellen amplifiziert und anschließend durch Zuhilfenahme dreier Caesiumchlorid Gradienten aufgereinigt [39]. Der Virustiter wurde schließlich photometrisch bei einer

Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

### **2.2.1.3 Adenovirale Transduktion und Bestimmung der Transgenexpression**

Bei 60-80%-iger Konfluenz wurden die hMSZ (ca.  $6 \cdot 10^6$  Zellen/175 cm<sup>2</sup>-Flasche) zuerst mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden 4 mL virenhaltiges Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM High Glucose) + 1% Penicillin/Streptomycin (100x)) hinzugegeben. Die Viruslast betrug ca.  $5 \cdot 10^3$  Viruspartikel/Zelle. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Nährmedium mit 20 mL SZM ersetzt.

Während der osteogenen Differenzierung wurde zu mehreren Messzeitpunkten nach 24-stündiger Inkubation 1 mL Mediumüberstand abgenommen und bei -80°C konserviert. Mittels kommerziell verfügbarer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kits wurde schließlich die IHH sowie die BMP-2 Konzentration im Mediumüberstand bestimmt.

## **2.2.2 Analyse der metabolischen Aktivität und des Proliferationsverhaltens**

### **2.2.2.1 Metabolische Aktivität**

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden transfizierte und nicht transfizierte hMSZ in Triplikaten bei einer Dichte von 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 96-Well-Platten ausgesät und mit Phenolrot-freiem SZM für 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Als Negativkontrolle diente Phenolrot-freies SZM. Zwei Stunden vor dem Analysezeitpunkt wurden zu jedem Well 10 µL der Alamarblau-Lösung hinzugefügt (Endkonzentration 10% v/v). Die Inkubation erfolgte unter lichtarmen Verhältnissen bei Standardbedingungen im Brutschrank. Bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 600 nm wurde die Absorption photometrisch bestimmt. Zu jedem Messzeitpunkt wurden zudem phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

### **2.2.2.2 Zellproliferationsassay**

Viral transfizierte und nicht transfizierte hMSZ wurden in Triplikaten mit einer Dichte von 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 24-Well-Platten ausgesät und mit 1 mL SZM pro Well bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 1, 3, 5, 7 und 10 Tage kultiviert. An jedem Messzeitpunkt wurde eine

24-Well-Platte zweimal mit PBS gewaschen und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse konserviert. Die Auswertung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Zellen wurden zunächst mit  $300\ \mu\text{L}$  Proteinase K-Lösung (Proteinase K gelöst in Phosphate Buffered EDTA (PBE) bei einer Endkonzentration von  $0,5\ \text{mg Proteinase K/mL PBE}$ ) pro 24-Well für  $12\ \text{h}$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  inkubiert. Das Lysat wurde anschließend in Eppendorf-Röhrchen überführt und für weitere  $8\ \text{h}$  bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Um den DNA Gehalt jeder Probe zu bestimmen, wurde der Qubit® dsDNA BR Assay verwendet. Dafür wurden von jeder Probe Triplikate von jeweils  $10\ \mu\text{L}$  in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert und  $190\ \mu\text{L}$  der Qubit-Arbeitslösung hinzugefügt. Zudem wurde mit einem DNA-Standard eine Verdünnungsreihe angefertigt. Nach kurzem Vortexen und Inkubation für  $3\ \text{min}$  erfolgte die Fluoreszenzmessung bei einer Exzitationswellenlänge von  $485\ \text{nm}$  und einer Emissionswellenlänge von  $530\ \text{nm}$ .

## **2.2.3 Methoden zum Nachweis der osteogenen Differenzierung**

### **2.2.3.1 Nachweis der alkalische Leukozytenphosphatase-Aktivität**

Es wurden die hMSZ der unterschiedlichen Gruppen in Triplikaten bei einer Dichte von  $3000\ \text{Zellen/cm}^2$  auf 24-Well-Platten ausgesät und mit  $1\ \text{mL}$  osteogenem Differenzierungsmedium (ODM) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  für  $1, 7, 14, 21$  und  $28$  Tage kultiviert. Vierundzwanzig Stunden vor dem jeweiligen Messzeitpunkt wurde das entsprechende Medium durch ein fötales Kälberserum (FCS)- und Phenolrot-freies Medium ersetzt. Zur Analyse wurde der Mediumüberstand in  $1,5\ \text{mL}$  Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend wurden Triplikate von  $100\ \mu\text{L}$  auf einer 96-Well-Platte auspipettiert. Als Negativkontrollen dienten Triplikate von  $300\ \mu\text{L}$  Phenolrot- und FCS-freiem Medium, von  $100\ \mu\text{L}$  Phenolrot- und FCS-freiem Medium mit  $200\ \mu\text{L}$  para-Nitrophenylphosphat (p-NPP)-Lösung sowie von  $300\ \mu\text{L}$  p-NPP-Lösung. Zu den Wells mit  $100\ \mu\text{L}$  Inhalt wurden jeweils  $200\ \mu\text{L}$  der p-NPP-Lösung hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine dreistündige Inkubation auf dem Rüttler unter lichtarmen Bedingungen. Schließlich wurde die optische Dichte photometrisch bei einer Messwellenlänge von  $405\ \text{nm}$  bestimmt.

### **2.2.3.2 Nachweis von Kalzium**

Der Kalzium Nachweis wurde mit dem Kalzium O-Cresolphthalein Kit durchgeführt. Dafür wurden viral transfizierte und nicht transfizierte hMSZ in Triplikaten mit einer Dichte von  $3000\ \text{Zellen/cm}^2$  auf 24-Well-Platten ausgesät und mit  $1\ \text{mL}$  ODM bzw. die Kontrollen mit Standardmedium (SM) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  für  $7, 14, 21$  und

28 Tage kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und zweimaligen Waschen mit Aqua destilata (Aq. dest.) wurden die Wells für 30 Minuten mit 160  $\mu\text{L}$  10%-iger Essigsäure versetzt und anschließend erfolgte die Ablösung des Zellrasens vom Plattenboden mithilfe eines Zellschabers. Die Proben wurden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, für 30 s gevortext und für 10 min auf 85°C erhitzt. Daraufhin wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert, bei 13000 g für 20 min zentrifugiert, 500  $\mu\text{L}$  des Überstands in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 40  $\mu\text{L}$  Ammoniumhydroxidlösung (10%) neutralisiert. Um eine Quantifizierung der Proben durchführen zu können, wurden 10  $\mu\text{L}$  jeder Probe (Triplikate) auf eine 96-Well-Platte überführt. Danach wurden in jedes Well 200  $\mu\text{L}$  der Kalzium O-Cresolphthalein Lösung pipettiert. Bei alkalischem pH-Wert bildet O-Cresolphthalein mit Kalzium einen farbigen Komplex. Nach kurzer Inkubation bei 37°C erfolgte ein photometrischer Nachweis bei einer Messwellenlänge von 600 nm.

### **2.2.3.3 Alizarinrot S-Färbung**

Die Alizarinrot S-Färbung diente zur Detektion von Kalziumhydrogenphosphaten. Dafür wurden viral transfizierte und nicht transfizierte hMSZ in Triplikaten mit einer Dichte von 3000 Zellen/ $\text{cm}^2$  auf 6-Well-Platten ausgesät und mit 3 mL ODM oder SM bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  für 7, 14, 21 und 28 Tage kultiviert. Zur Färbung wurde der Zellrasen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Färbung mit 1%-iger Alizarinrot S-Lösung für 20 min und anschließendem dreimaligem Waschen mit Aq. dest. wurden die Zellen luftgetrocknet. Die Kalziumphosphatpräzipitate erschienen hell- bis dunkelrot. Bis zur Quantifizierung der Färbung wurden die 6-Well-Platten bei -20°C gelagert. Zur Analyse wurden die Alizarinrot-gefärbten Wells für 30 Minuten mit 800  $\mu\text{L}$  10%-iger Essigsäure versetzt. Danach erfolgte die Ablösung des Zellrasens vom Plattenboden mithilfe eines Zellschabers. Die Proben wurden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, für 30 s gevortext und für 10 min auf 85°C erhitzt. Daraufhin wurden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert, für 20 min bei 13000 g zentrifugiert, 500  $\mu\text{L}$  des Überstands in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 200  $\mu\text{L}$  Ammoniumhydroxidlösung (10%) neutralisiert. Danach wurden von jeder Probe Triplikate von 150  $\mu\text{L}$  auf eine 96-Well-Platte pipettiert und die optische Dichte bei einer Messwellenlänge von 405 nm bestimmt.

## 2.2.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Hierfür wurden viral transfierte und nicht transfierte hMSZ in Triplikaten mit einer Dichte von 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 6-Well-Platten ausgesät und mit 3 mL ODM bzw. die Kontrollen mit SM bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, für 7, 14, 21 und 28 Tage kultiviert.

### 2.2.4.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) der Zellmonolayer wurde das NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey-Nagel verwendet. Hierbei wurden die Zellmonolayer nach Entfernen des Kulturmediums mit 350 µL RA1-Puffer und 3,5 µL β-Mercaptoethanol lysiert und mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Die Lysate der Triplikate wurden gepoolt und in ein steriles, RNase-freies 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Prozessierung wurden die Proben bei -20°C gelagert. Die anschließende RNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die gereinigten Proben wurden nach Zugabe des gleichen Volumens an 70%-igem Ethanol auf Silica-Gel-Membran-Säulen pipettiert. Nach einem DNase-Verdau zur Eliminierung genomischer DNA und anschließender Aufreinigung erfolgte die Eluation der RNA in 40 µL RNase-freiem H<sub>2</sub>O. Bis zur Konzentrationsbestimmung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Im Anschluss daran erfolgte die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA)-Synthese.

### 2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte mithilfe eines Biophotometers. Zu diesem Zweck wurden in einer UV-durchlässigen Küvette 48 µL Wasser für Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC-H<sub>2</sub>O) mit 2 µL isolierter RNA bzw. DNA gemischt. Als Referenzwert diente HPLC-H<sub>2</sub>O ohne Zugabe von Nukleinsäure. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von RNA und DNA, wobei ein optische Dichte (OD)<sub>260</sub>-Wert von 1 einer Konzentration von 40 µg/mL entspricht. Mittels der Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> und OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> konnte die Reinheit der Proben bestimmt werden. Reine RNA liegt bei einem OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von 2,0 vor. DNA sollte einen OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von 1,8 aufweisen. In beiden Fällen ist eine Verunreinigung durch organische Substanzen ab einem OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> von 2,0 ausgeschlossen.

### 2.2.4.3 DNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels reverser Transkription. Je 1  $\mu\text{g}$  RNA wurde hierfür mit 1  $\mu\text{L}$  Random Hexamer-Oligonukleotiden (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) versetzt und mit HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  auf 11  $\mu\text{L}$  aufgefüllt.

Die Denaturierung von sekundären RNA-Strukturen, sowie die Bindung der Random Hexamer-Oligonukleotide an die Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) wurden durch Denaturierung für 5 min im Heizblock bei  $70^\circ\text{C}$  mit anschließender Inkubation auf Eis erreicht. Der Ansatz wurde mit einem Mix aus 4  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer (5x), 1  $\mu\text{L}$  10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), 0,25  $\mu\text{L}$  BioScript Reverse Transkriptase (200 u/microL) und 2,75  $\mu\text{L}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  auf 20  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte über 1 h die Elongation der cDNA im Thermocycler bei  $42^\circ\text{C}$ . Dieser Prozess wurde schließlich durch eine finale, zehnminütige Inkubation bei  $70^\circ\text{C}$  abgestoppt. Alle cDNA-Proben wurden nach der Reversen Transkription mit 30  $\mu\text{L}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt.

Um eine genomische DNA-Kontamination ausschließen zu können, wurde bei jeder reversen Transkription eine Negativ-Kontrolle ohne RNA hergestellt. Diese wurde mittels semi-quantitativer PCR auf *EEF1A1* überprüft.

### 2.2.4.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) dient zur Detektion und Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels spezifischer Primer und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Sie wird mithilfe eines Lightcyclers durchgeführt. Dabei wird die bei den einzelnen qRT-PCR-Zyklen entstandene Produktmenge durch den Einbau eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt. Bei diesem handelt es sich um das sogenannte SybrGreen I, das es ermöglicht, die Kopienzahl der ursprünglich eingesetzten Matrize zu quantifizieren. SybrGreen I ist ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff mit der Summenformel  $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{S}_2$ . Dieser begünstigt eine spezifische Primerbindung während des Annealing-Schrittes in jedem qRT-PCR-Zyklus. SybrGreen I interkaliert in doppelsträngige DNA-Moleküle unter der Absorption von blauem Licht (Wellenlänge ( $\lambda_{max} = 494 \text{ nm}$ )) und der Emission von grünem Fluoreszenzlicht ( $\lambda_{max} = 521 \text{ nm}$ ) [40]. Mit zunehmender Zyklenzahl und damit größer werdenden Mengen an spezifischem doppelsträngigem Produkt nimmt dementsprechend die im Lightcyclus detektierbare Fluoreszenz zu. Über die Verdünnungsreihe eines Standards mit genau definierter Kopienzahl wird eine Eichkurve erstellt, anhand derer bestimmt werden kann, wie viele Kopien der

Matrize ursprünglich in der Probe vorlagen. Da SybrGreen I nicht nur in spezifische Produkte, sondern auch in Primerdimere und doppelsträngige Nebenprodukte interkaliert, erfolgte im Anschluss an die qRT-PCR ein Nachweis der Spezifität der generierten Produkte über die Schmelzkurvenanalyse.

Um Ergebnisse einzelner Proben besser vergleichen zu können, wurde parallel das sogenannte Housekeeping-Gen RPS27A gemessen. Dieses diente als interner Standard, da angenommen wird, dass seine Expression weitgehend unabhängig von externen Faktoren ist. Somit wurde ein Quotient aus der Kopienzahl des untersuchten Gens zu der jeweiligen Kopienzahl des Housekeeping-Gens gebildet und in Relation gesetzt.

Unabhängig von der Menge der für die cDNA-Synthese eingesetzten RNA wurden pro Probe jeweils 7  $\mu\text{L}$  der cDNA-Lösung zusammen mit 63  $\mu\text{L}$  Mastermix in ein 1,5 mL Eppendorf Röhrchen pipettiert. Nach kurzem Vortexen und anschließendem Abzentrifugieren für 10 s bei 10000 g wurden daraus Triplikate von 20  $\mu\text{L}$  in 0,2 mL qRT-PCR-Strips hergestellt. Abschließend wurden die Strips mit einem Deckel verschlossen. Der Mastermix setzte sich aus 21  $\mu\text{L}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$ , 3,5  $\mu\text{L}$  forward Primer (5 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 3,5  $\mu\text{L}$  reverse Primer (5 pmol/ $\mu\text{L}$ ) sowie 35  $\mu\text{L}$  KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix zusammen. Dieser enthält neben SybrGreen I die DNA-Polymerase, eine Pufferlösung, dNTPs sowie  $\text{MgCl}_2$ . Anschließend wurden die Strips in die Lightcycler-Apparatur gestellt. Die PCR-Bedingungen blieben bei allen Experimenten unverändert.

Die qRT-PCR besteht aus einer Kette von sich wiederholenden Temperaturgefällen, beginnend mit einem Denaturierungsschritt, um DNA-Doppelstränge voneinander zu lösen. Zur Bindung der Primer an einzelsträngige DNA (Annealing) folgt daraufhin die Herabsetzung auf eine Primer-spezifische Temperatur. Schließlich ist noch ein Elongationsschritt notwendig, bei dem die DNA-Polymerase mittels dNTPs den jeweiligen cDNA-Strang in 5' - 3'-Richtung kopiert. Die Standard-Bedingungen für die qRT-PCR sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tab. 1:** Bedingungen für die quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Initiale Denaturierung	95	180
Denaturierung	94	10
Annealing	60	10
Elongation	72	20

### 2.2.4.5 Primer

Alle Primer für die qRT-PCR wurden von der Firma Biozym Scientific GmbH in Hesse Oldendorf, Deutschland, bezogen und sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2:** Liste der verwendeten Primer

Gen	Elongationsrichtung	Sequenz (5'-3')	Amplikon-Länge [bp]	Annealing-Temperatur [°C]
ALPL	vorwärts	GTACGAGCTGAACAGGAACAACG	151	58
ALPL	rückwärts	CTTGGCTTTTCCTTCATGGTG	151	58
OC	vorwärts	TGACCACATCGGCTTTCAG	126	60
OC	rückwärts	AAGGGGAAGAGGAAAGAAGG	126	60
OP	vorwärts	TATGATGGCCGAGGTGATAG	133	60
OP	rückwärts	CATTCAACTCCTCGCTTTCC	133	60
S27A	vorwärts	TCGTGGTGGTGCTAAGAAAA	141	60
S27A	rückwärts	TCTCGACGAAGGCGACTAAT	141	60
Runx2	vorwärts	CTTCACAAATCCTCCCAAG	147	58
Runx2	rückwärts	ATGCGCCCTAAATCACTGAG	147	58

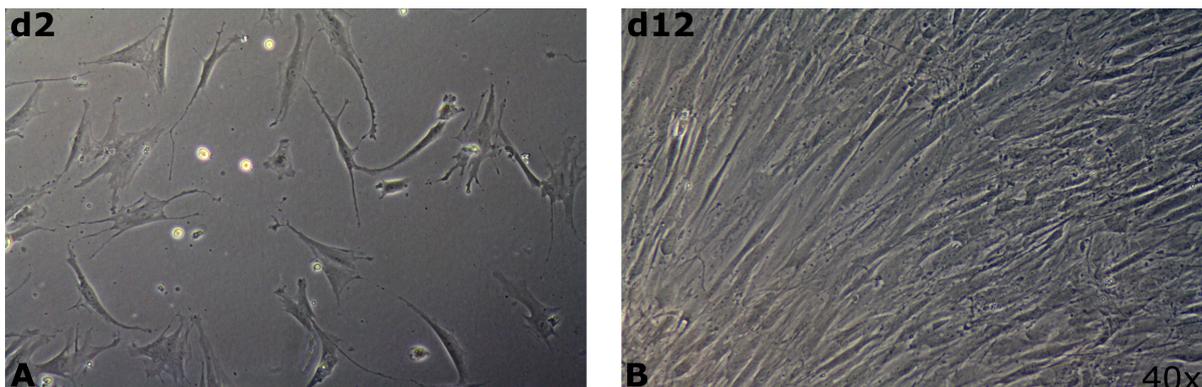
### **2.2.5 Statistische Datenanalyse**

Die statistische Datenanalyse erfolgte unter Verwendung von ANOVA (IBM SPSS 19.0). P-Werte  $< 0.05$  wurden dabei als statistisch signifikant erachtet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen wurden durch Adhärenz selektiert und offenbart unter Kulturbedingungen ein typisches Wachstum in Kolonien. Nach zwei Tagen waren ovale sowie spindelförmige, nicht-konfluente Zellen zu erkennen (Abb. 2 A). Im weiteren Verlauf wuchsen zunehmend fibroblastäre Zellen mit hoher mitotischer Aktivität, sodass innerhalb von 12 Tagen ein konfluenter Zellrasen aus spindelförmigen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen entstand (Abb. 2 B).



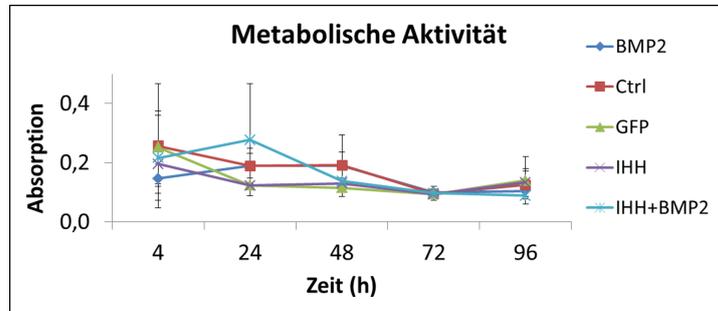
**Abb. 2:** Mononukleäre, humane mesenchymale Stammzellen nach 2 (A) und 12 Tagen (B) in Zellkultur. Vergrößerung 40x.

#### 3.1.1 Analyse des Wachstumsverhaltens transfizierter und nicht transfizierter humaner mesenchymaler Stammzellen

Nach der viralen Transduktion der hMSZ mit Ad.IHH, Ad.BMP-2, Ad.GFP oder Ad.BMP-2 und Ad.IHH in Kombination wurde das Wachstumsverhalten der transfizierten und nicht transfizierten hMSZ analysiert. Zudem wurde die Transgenexpression der hMSZ untersucht.

### 3.1.1.1 Metabolische Aktivität

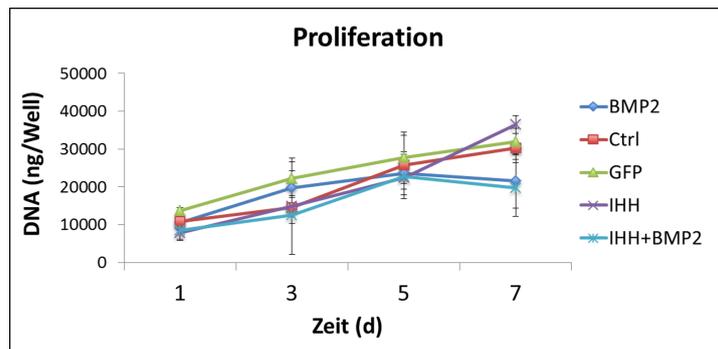
Die virale Transduktion der hMSZ mit Ad.IHH, Ad.BMP-2, Ad.GFP oder Ad.BMP-2 und Ad.IHH in Kombination führte innerhalb der ersten 72 h nach Transduktion zu einer geringen, jedoch nicht signifikanten Abnahme der metabolischen Aktivität (Abb. 3).



**Abb. 3:** Metabolische Aktivität nativer (Ctrl) und transduzierter (BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP-2) humaner mesenchymaler Stammzellen.

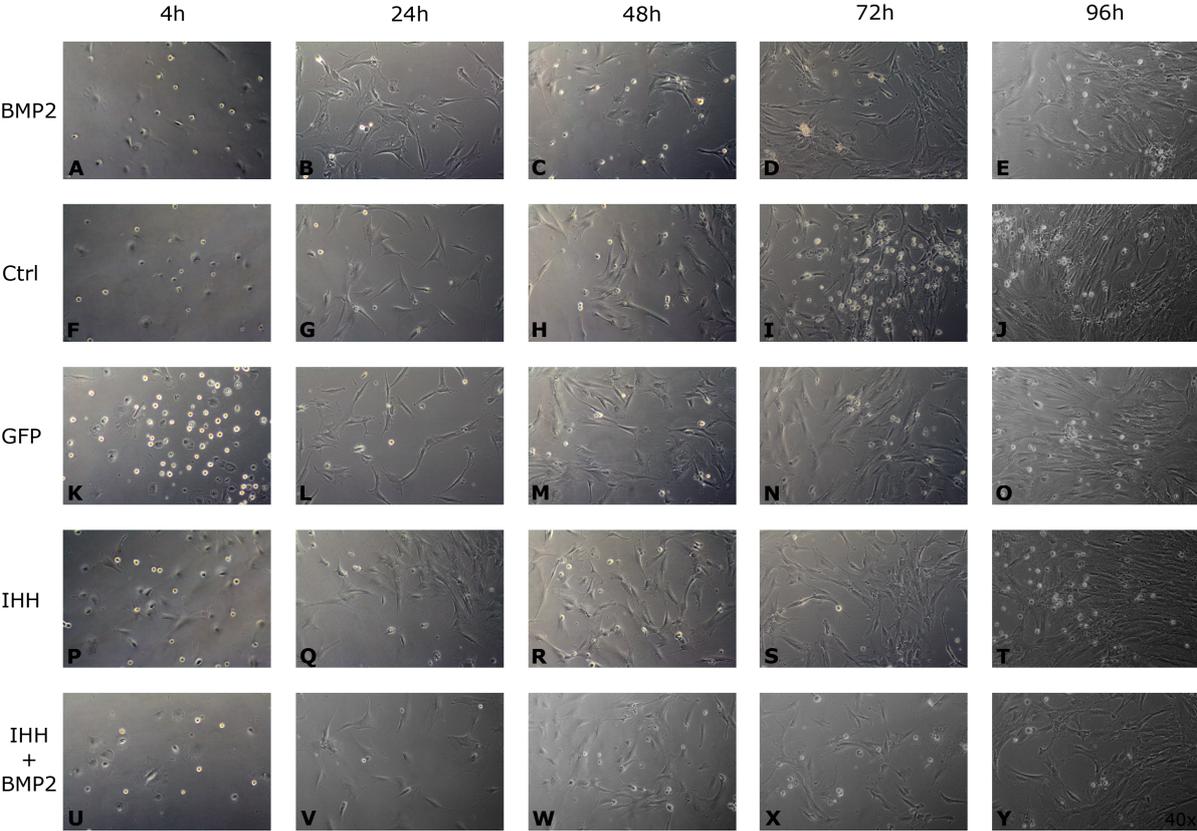
### 3.1.1.2 Proliferationsverhalten

Die genetische Modifikation der hMSZ hatte keinen negativen Einfluss auf deren Proliferationsverhalten. Alle transduzierten Zellen zeigten im Vergleich zu den nativen hMSZ ein normales Wachstumsverhalten. Hinsichtlich der verschiedenen Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. (Abb. 4).



**Abb. 4:** Proliferationsverhalten nativer (Ctrl) und transduzierter (BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP-2) humaner mesenchymaler Stammzellen.

Das Wachstumsverhalten der transfizierten und nicht transfizierten Zellen wurde an den Messzeitpunkten zur Bestimmung der metabolischen Aktivität, also nach 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden, mikroskopisch evaluiert. Hierbei konnten zwischen den unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Wachstumsverhalten und der Zellmorphologie beobachtet werden (Abb. 5).



**Abb. 5:** Zellmonolayerkulturen 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach viraler Transfektion. Darstellung von BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP2 exprimierenden Zellgruppen und nativen hMSZ, kultiviert in Standardmedium. Vergrößerung 40x.

### 3.1.2 Transgenexpression

Nach viraler Transduktion mit Ad.IHH, Ad.BMP-2, Ad.GFP oder Ad.BMP-2 und Ad.IHH in Kombination, zeigte sich an Tag 7 eine hohe Transgenexpression mit Werten zwischen 130 und 160 pg/mL für BMP-2 (Abb. 6 a) und Werten zwischen 160 und 250 pg/mL für IHH (Abb. 6 b). Die Bestimmung der Transgenexpression mittels ELISA offenbarte im weiteren Zeitverlauf eine kontinuierliche Abnahme.

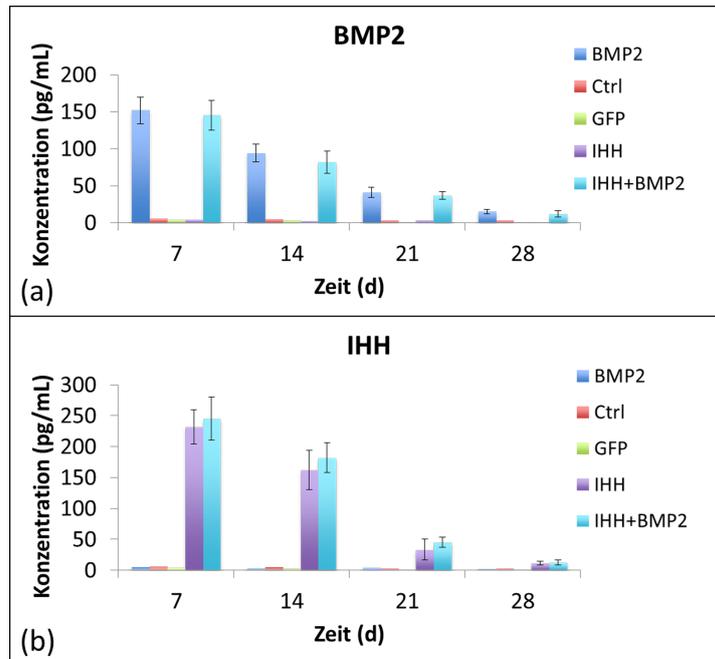
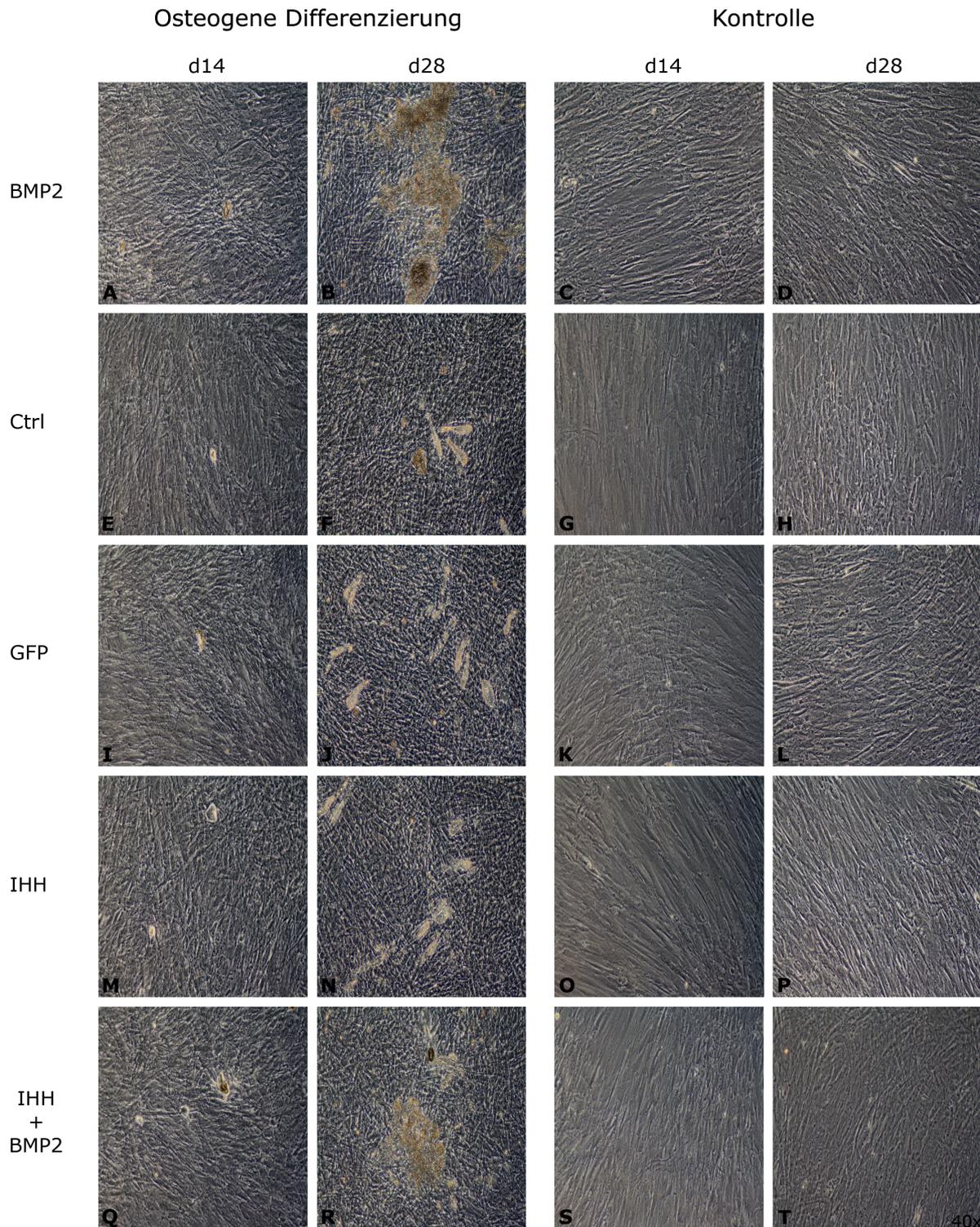


Abb. 6: Transgenexpression von BMP-2 (a) und IHH (b).

## 3.2 Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Monolayerkultur

Konfluente Monolayerkulturen wurden für 28 Tage mit osteogenem Medium zur Differenzierung stimuliert und histologisch sowie mittels qRT-PCR analysiert. Als Kontrollpopulation dienten für 28 Tage in SZM kultivierte hMSZ. Zusätzlich erfolgte an den Tagen 7, 14, 21 und 28 eine native mikroskopische Untersuchung der Monolayerkulturen der unterschiedlichen Gruppen zur Beurteilung der Zellmorphologie und des Wachstumsverhaltens (Abb. 7).

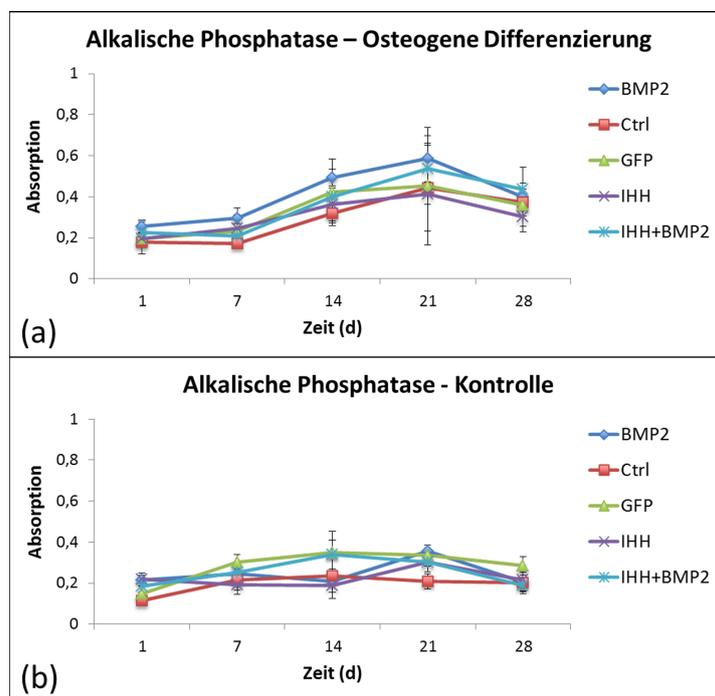


**Abb. 7:** Native Zellmonolayerkulturen an den Tagen 14 und 28 von BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP2 exprimierenden Zellgruppen und nativen hMSZ, kultiviert in osteogenem sowie in Kontrollmedium. Vergrößerung 40x.

## 3.2.1 Histochemische Analyse

### 3.2.1.1 Alkalische Leukozytenphosphatase-Aktivität

Die Induktion der osteogenen Differenzierung bewirkte in allen Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen einen Anstieg der ALP-Aktivität. Die Enzymaktivität zeigte dabei das typische „rise and fall“ Muster, mit einer frühen, maximalen Aktivität an den Tagen 14 und 21 nach osteogener Induktion. An Tag 21 offenbarten die Gruppe der mit BMP-2 bzw. die Gruppe der mit der Kombination von BMP-2 und IHH transduzierten hMSZ eine signifikant höhere Enzymaktivität im Vergleich zu den nativen hMSZ (Abb. 8 a und b). Allerdings konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestimmt werden.

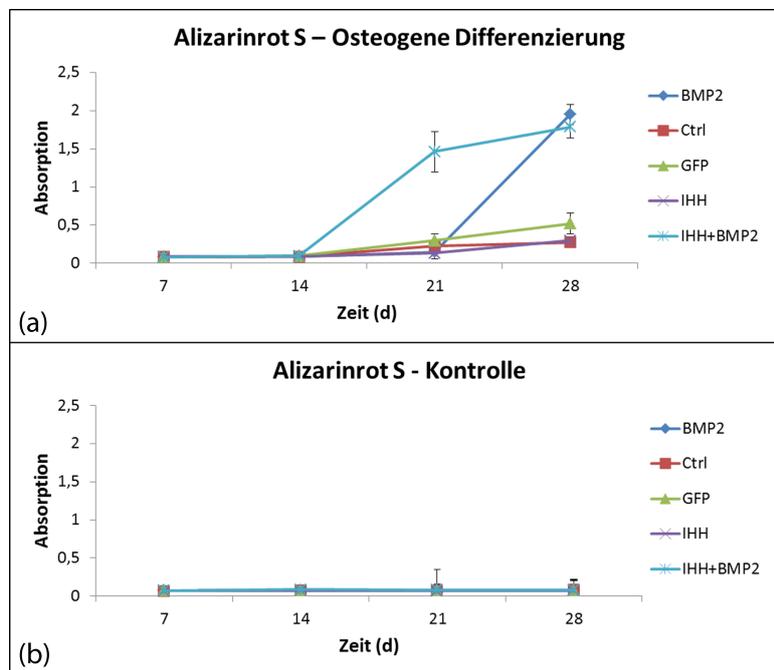


**Abb. 8:** Alkalische Leukozytenphosphatase-Aktivität osteogen differenzierter Gruppen (a) und undifferenzierter Kontrollgruppen (b).

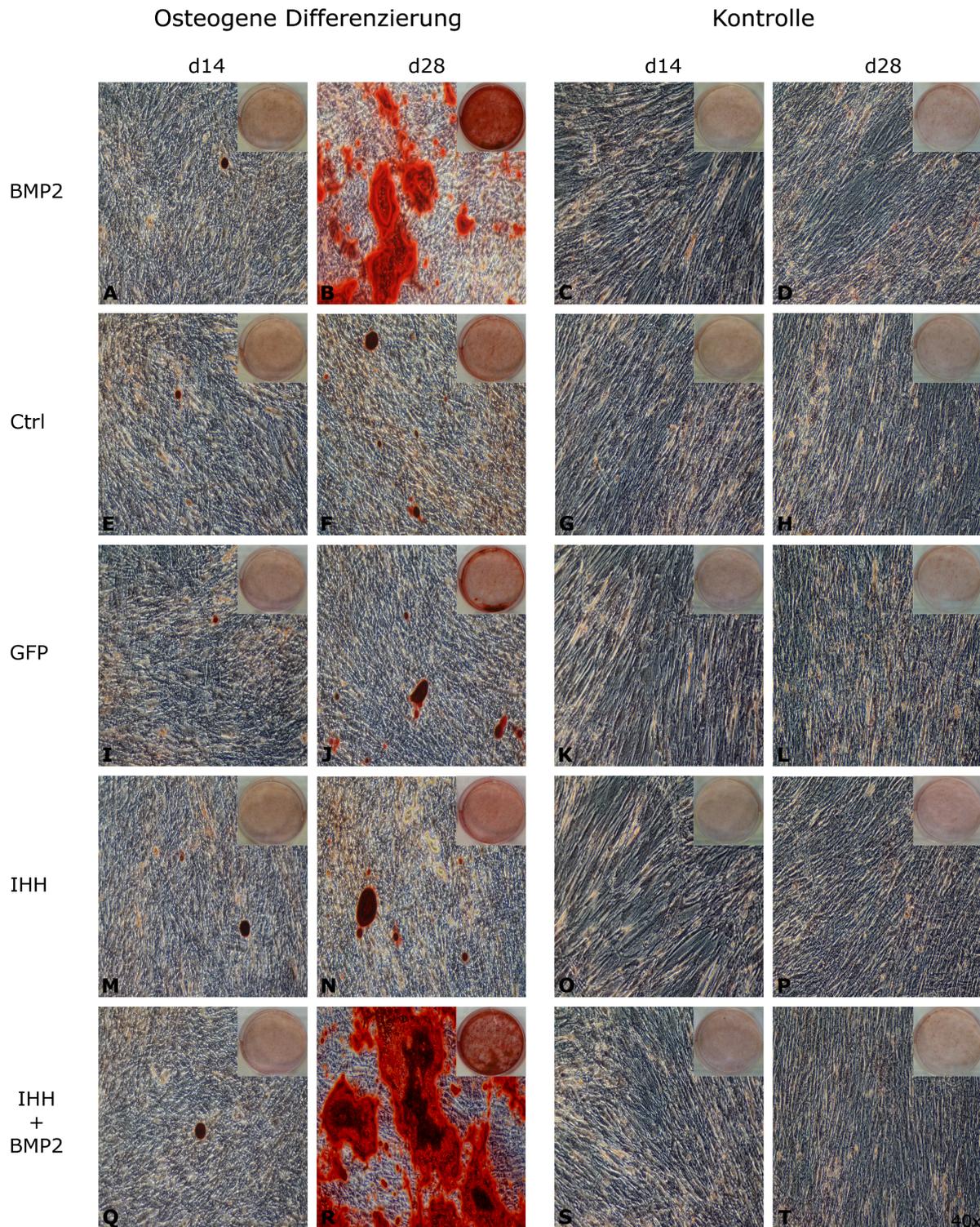
### 3.2.1.2 Histologie

Verglichen mit den Kontrollen bildeten die osteogen induzierten Gruppen bereits nach 14 Tagen vermehrt mineralisierte Extrazellulärmatrix. An Tag 21 zeigten die mit BMP-2 und IHH transduzierte Zellen eine signifikant stärkere Mineralisierung als alle anderen Zellgruppen. Im weiteren Verlauf konnte an Tag 28 bei den osteogen induzierten Gruppen, die BMP-2 und BMP-2 in Kombination mit IHH überexprimierten, eine ähnlich ausgeprägte Mineralisierung der Extrazellulärmatrix beobachtet werden. Das Mineralisierungspotential dieser beiden Gruppen war den übrigen signifikant überlegen (Abb. 9 a und b, Abb. 10).

Die Quantifizierung der Alizarinrot-Färbung korrelierte hierbei mit den Ergebnissen des Kalzium-Assays, welcher Werte zwischen 0,025 und 0,1 mg/6-Well ergab (Abb. 9).



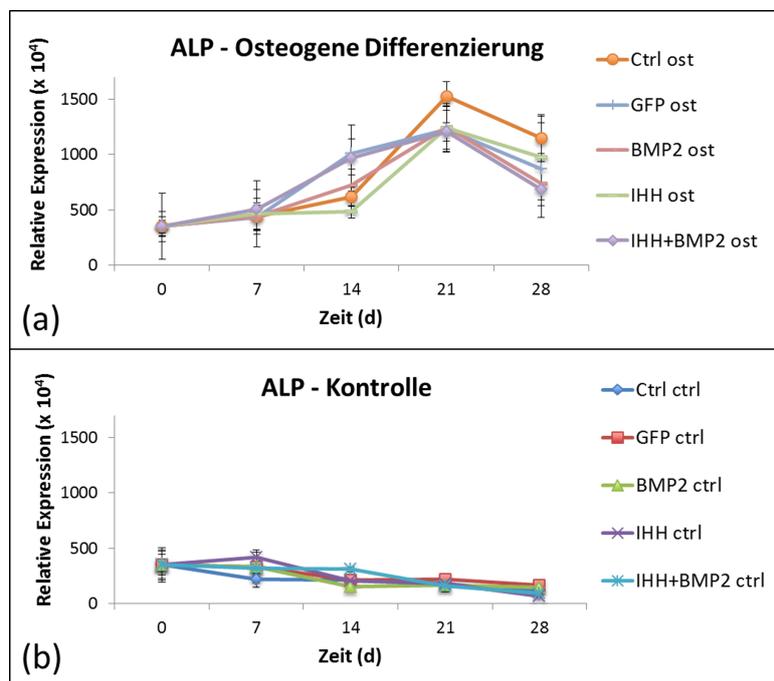
**Abb. 9:** Quantifizierung der Alizarinrot-Färbung für osteogen differenzierte Gruppen (a) sowie undifferenzierte Kontrollgruppen (b).



**Abb. 10:** Zellmonolayerkulturen nach Alizarinrot-Färbung an den Tagen 14 und 28 von BMP-2, GFP, IHH und IHH+BMP2 exprimierenden Zellgruppen und nativen hMSZ, kultiviert in osteogenem sowie in Kontrollmedium. Vergrößerung 40x.

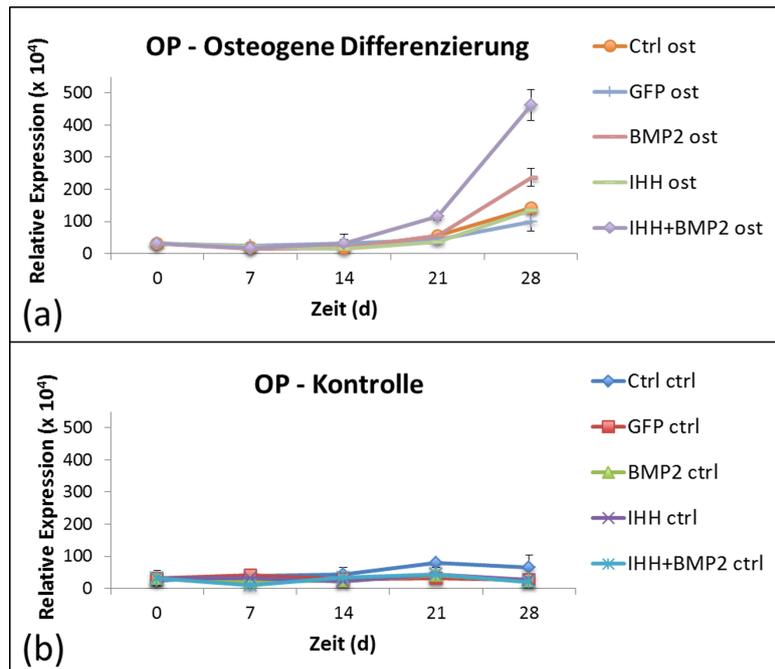
### 3.2.2 Genanalyse mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase Ketten Reaktion

Die an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 gemessene ALP-Expression zeigte ein typisches „rise and fall“ Muster, was mit den Ergebnissen der histochemischen Analyse der ALP-Aktivität übereinstimmte. An Tag 21 konnte, verglichen mit Tag 0, ein statistisch signifikanter Anstieg ( $p < 0.05$ ) der ALP-Expression in den osteogen induzierten Gruppen nachgewiesen werden. Allerdings war am Tag der maximalen Genexpression (d21) kein signifikanter Unterschied innerhalb der osteogen induzierten Gruppen zu beobachten. Die ALP-Expression in den nicht induzierten Kontrollgruppen hielt sich über den gesamten Untersuchungszeitraum auf einem konstant niedrigen Level (Abb. 11).

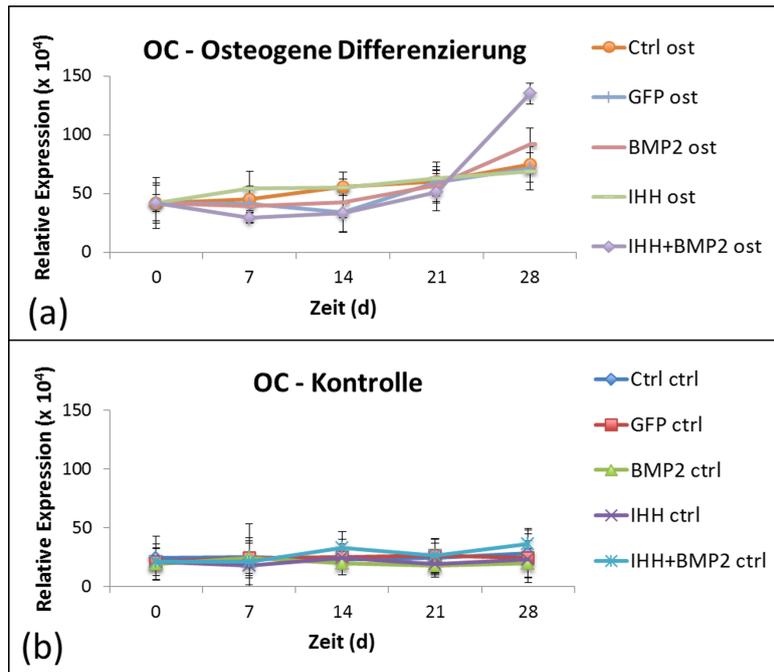


**Abb. 11:** Genexpression der alkalischen Leukozytenphosphatase (ALP) in den osteogen differenzierten Gruppen (a) und in den undifferenzierten Kontrollgruppen (b) im zeitlichen Verlauf.

Die Genexpression sowohl von Osteopontin (OP) (Abb. 12) als auch von Osteocalcin (OC) (Abb. 13) offenbarte im zeitlichen Verlauf, in den in ODM kultivierten Gruppen, einen signifikanten Anstieg einerseits verglichen mit der Expression an Tag 0 und andererseits verglichen mit dem Expressionslevel in den, in SM, kultivierten Kontrollgruppe. An Tag 28 konnte eine signifikant höhere Expression beider Gene in den mit BMP-2 und mit der Kombination von BMP-2 und IHH transduzierten Gruppen nachgewiesen werden, wobei die höchste Genexpression bei den Zellen beobachtet wurde, die gleichzeitig BMP-2 und IHH überexprimierten.

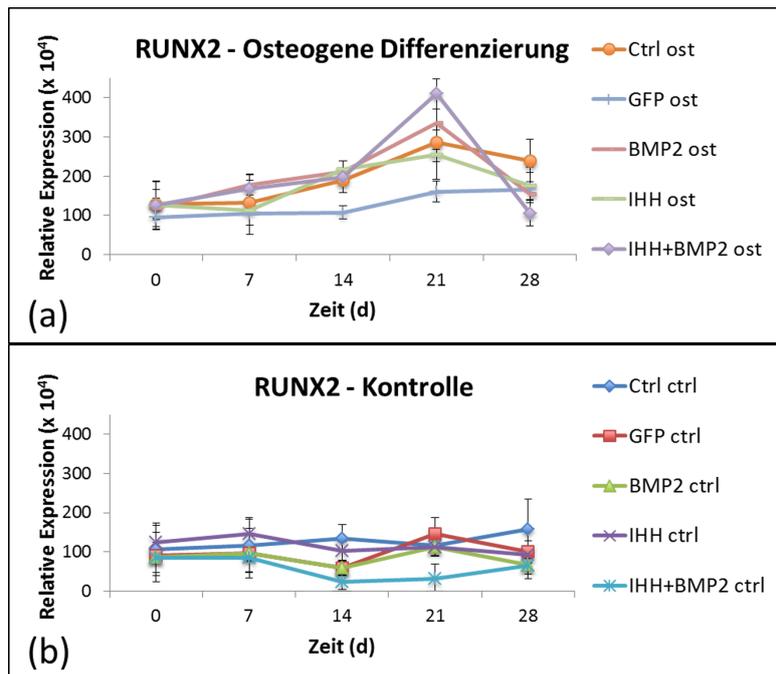


**Abb. 12:** Genexpression von Osteopontin (OP) in den osteogen differenzierten Gruppen (a) und in den undifferenzierten Kontrollgruppen (b) im zeitlichen Verlauf.



**Abb. 13:** Genexpression von Osteocalcin (OC) in den osteogen differenzierten Gruppen (a) und in den undifferenzierten Kontrollgruppen (b) im zeitlichen Verlauf.

Ähnlich wie ALP zeigte Runx2 bis zu Tag 21 einen signifikanten Anstieg der Genexpression in den osteogen induzierten Gruppen. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu einer Abnahme der Runx2-Expression bis Tag 28. Die Expression dieses Transkriptionsfaktors war an Tag 21 in den osteogen induzierten Gruppen, die BMP-2 bzw. die Kombination von IHH und BMP-2 überexprimierten, signifikant höher als in allen anderen osteogen induzierten Gruppen. In den nicht-induzierten Kontrollen lagen die Messwerte für die Runx2-Expression auf einem konstant niedrigen Niveau (Abb. 14).



**Abb. 14:** Genexpression von Runx2 in den osteogen differenzierten Gruppen (a) und in den undifferenzierten Kontrollgruppen (b) im zeitlichen Verlauf.

# 4 Diskussion

## 4.1 Grundlagen

Eine suffiziente Knochenheilung hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. Dazu zählen unter anderem die Zellmigration, die Zellproliferation sowie die osteogene Differenzierung von hMSZ im Bereich der Läsion. Der Heilungsprozess unterliegt durch das Zusammenspiel zahlreicher molekularer Signalwege einer komplexen Regulation. Neben vielen anderen Signaltransduktionskaskaden spielt unter anderem der Hedgehog-Signalweg bei der Regulierung von Heilungsprozessen eine große Rolle. Auch über diese Kaskade werden Migration, Proliferation sowie Differenzierung embryonaler- sowie adulter Stamm- und/oder Vorläuferzellen gesteuert [33].

Nach Bindung des Hedgehog-Proteins an die membranständigen Rezeptoren Patched-1 und Smoothend erfolgt die Signaltransduktion ins Zellinnere über Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie, die zu den Zinkfingerproteinen zählen (Gli1, Gli2 und Gli3) [26]. Es ist bekannt, dass der Hedgehog-Signalweg bei der Skelettmorphogenese eine Rolle spielt [27]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei Mäuseembryonen, die IHH nicht exprimierten, die typische perichondrale Expression von osteogenen Markergenen wie Runx2, Kollagen 1 und ALP fehlte [28]. Deshalb nimmt man an, dass der IHH-Signalweg die frühe Osteoblastogenese durch die Modulation von Runx2 beeinflusst.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir, ob die adenovirale Transduktion von IHH dazu beiträgt, das osteogene Potential von hMSZ zu verbessern. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass, im Rahmen unseres spezifischen Studiendesigns, die alleinige Überexpression von IHH in hMSZ kein verbessertes osteogenes Differenzierungsverhalten induziert. Dagegen resultiert die gleichzeitige Überexpression von IHH in Kombination mit BMP-2 in einer beschleunigten Mineralisierung und in einer Mehrexpression der osteogenen Markergene OP und OC. Sowohl im Hinblick auf das Mineralisierungsverhalten als auch auf die Markergen-Expression erhielten wir bessere Ergebnisse als in der ausschließlich mit Ad.BMP-2 transduzierten Gruppe. Dementsprechend scheinen IHH und BMP-2 einen synergistischen Effekt zu haben.

BMPs zählen zu den bereits weitreichend untersuchten Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie. Unter anderem induzieren sie sowohl die Bildung von Knochen als auch von Knorpel durch die Stimulation von intrazellulären Prozessen in hMSZ [41]. Allerdings wird nicht allen BMPs eine osteoinduktive Wirkung zugeschrieben. Nachgewiesen ist ein osteogenes Potential bisher lediglich für BMP-2, -4, -7 und -9 [42].

## 4.2 Synergismus von BMP-2 und IHH

Wie bereits erwähnt deuten die vorliegenden Untersuchungsergebnisse auf eine synergistische Wirkung von IHH und BMP-2 bei der osteogenen Differenzierung von hMSZ hin. Bekanntermaßen ist Sonic Hedgehog (SHH) bei der Induktion osteogener Differenzierungsvorgänge auf intakte BMP-Signalwege angewiesen [43]. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Hedgehog (HH)-Proteine in Kombination mit BMP-2 synergistisch die ALP-Aktivität in KS483 Zellen induzieren [44]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass sowohl IHH als auch SHH in Synergismus mit BMP-2 die ALP-Aktivität in den Zelllinien C3H10T1/2 und MC3T3-E1 steigert [45]. Gleichzeitig bewirkte die Substitution von rekombinantem, N-terminalem SHH eine verstärkte Aktivierung der BMP-Signalkaskade, was in einem Anstieg der ALP-Aktivität in den untersuchten Zelllinien C3H10T1/2 und ST2 sowie in primären osteoblastären Vorläuferzellen von Mäusen resultierte [43]. Die ALP-Aktivität wird als ein Marker der osteoblastären Aktivität *in vitro* angesehen. Normalerweise zeigt die ALP-Aktivität ein typisches „rise and fall“ Muster [46], was sich auch in unseren Ergebnissen widerspiegelt.

Es wird darüber hinaus vermutet, dass der Einfluss von HH-Proteinen vom Ausmaß der Zelldifferenzierung abhängen könnte. Bereits stark differenzierte Zelllinien, wie beispielsweise osteoblastäre Zelllinien oder die präosteoblastische Zelllinie MC3T3-E1, reagierten unter Stimulation mit BMP-2 nicht auf SHH. Dagegen konnte bei der eher pluripotenten Zelllinie C3H10T1/2 ein Effekt nachgewiesen werden [43]. Folglich scheint sich die Beteiligung der HH-Signalwege an der Osteoblastogenese eher auf die frühen Stadien der osteogenen Differenzierung zu beschränken. Die Tatsache, dass in unserer Studie undifferenzierte, multipotente hMSZ verwendet wurden, könnte den positiven Einfluss von IHH in unseren Versuchsreihen erklären. Studienergebnisse, die zeigen, dass osteoblastäre perichondrale Vorläuferzellen der Maus bei fehlender IHH-Transduktionskaskade eher den Weg der Chondrogenese als den der Osteogenese einschlagen [47], untermauern diese Hypothese.

Bemerkenswerterweise bestehen alle HH-Proteine aus einem Signalpeptid mit einer gut konservierten N-terminalen Region. In Folge dessen sind HH-Liganden funktionell austauschbar [26]. Somit können mit hoher Wahrscheinlichkeit die für SHH erlangten Erkenntnisse auf IHH übertragen werden.

In der Literatur werden, unter Einfluss von oder ohne BMP-2, speziesspezifische Effekte von IHH auf die Osteoblastogenese beschrieben. Während HH - in Synergismus mit BMP-2 - die Osteoblastogenese bei Mäusen zu fördern scheint, könnte es in einer anderen Spezies zu nicht-synergistischen oder gar antagonistischen Effekten kommen. In einem Rattenmodell führte SHH über den Runx2-Signalweg zur verstärkten enchondralen Ossifikation. Bei gleichzeitiger Zugabe geringer Mengen BMP-4 war jedoch keine vermehrte Ossifikation zu beobachten [48]. In aus Fettgewebe gewonnenen humanen Stammzellen führte SHH sogar zur Inhibition der Osteogenese. Dies konnte anhand einer abnehmenden ALP- und Runx2-Expression belegt werden [49].

### 4.3 Expression osteogener Markergene

Runx2, auch bekannt als Core-Binding Factor subunit alpha-1 (CBF-alpha-1), gilt als eines der wichtigsten Regulatorgene für die osteoblastäre Differenzierung, die Zellmatrixproduktion sowie die Mineralisierung während der Knochenbildung. In unserer Studie zeigte sich aufgrund der beobachteten synergistischen Effekte nach adenoviraler Transduktion mit Ad.IHH und Ad.BMP-2 eine signifikante Runx2-Überexpression. Die Runx2-Expression ist notwendig, um sowohl eine Aktivierung als auch eine Differenzierung von Osteoblasten zu erreichen. Das Fehlen von Runx2 bei Mäusen führt zu einem kompletten Ausbleiben der Knochenbildung [50]. In proliferierenden Chondrozyten ist die Runx2-Genexpression hochreguliert. Außerdem ist die Expression von Runx2 während der Osteoblastogenese bereits zu sehr frühen Zeitpunkten nachweisbar. Die Runx2-Expression kann durch verschiedene molekulare Signalwege stimuliert werden [51]. Umgekehrt kontrolliert Runx2 über eine direkte Bindungsstelle das Osteoblast-Specific cis-Activating Element (OSE2) und somit die Expression von Genen, die die Produktion von Extrazellulärmatrix im Knochengewebe regulieren. OSE2 ist in der Promotor-Region verschiedener Osteoblasten-spezifischer Gene wie OC, OP, Bone Sialoprotein (BSP) oder Kollagen 1 lokalisiert [52, 53].

Die nicht-kollagenösen Bestandteile der extrazellulären Matrix wie OC und OP bestimmen die physischen und chemischen Eigenschaften von Knochengewebe [54].

OC ist größtenteils in die Knochenmatrix eingelagert, wird aber auch zu Teilen in das zirkulatorische System abgegeben. Es gilt als später und spezifischer Marker der Osteogenese, da es die terminale Osteoblastogenese kennzeichnet und die Kristallisation der Knochenmatrix reguliert [55]. Nach simultaner adenoviraler Transduktion mit IHH und BMP-2 beobachteten wir eine signifikant höhere Expression von OC an Tag 28.

OP ist ein weiteres wichtiges Regulatorgen der Knochenbildung. In unseren Zellkultur-experimenten bewirkte die Transduktion von Ad.IHH und Ad.BMP-2 in Kombination eine signifikante Hochregulation der OP-Expression. OP gilt als Marker der frühen Osteogenese und weist eine hohe Affinität zu Kalzium auf. Zudem vermittelt OP über ein RGD motif die Bindung von Integrin-Rezeptoren. Deshalb fungiert OP als ein wichtiges Protein für die Zell-Matrix Interaktion [56]. Durch das RGD Motiv reguliert OP die Anlagerung sowie die Aktivierung von Osteoklasten [57] und kann zudem die Bindung von Knochenzellen an mineralisierte Gewebeoberflächen erleichtern [58].

## 4.4 Verwendung adenoviraler Vektoren zur Überexpression der Wachstumsfaktoren

Als virale Vektoren werden gezielt modifizierte Viruspartikel bezeichnet, die in der Gentechnik benutzt werden, um genetisches Material in Zielzellen zu integrieren. Der Transport von Nukleinsäuren in eine Zelle mit Hilfe eines Virus wird als Transduktion bezeichnet. Erstmals wurde die Technik der viralen Vektoren im Jahr 1976 von Goff et. al. [59] beschrieben und seitdem kontinuierlich weiterentwickelt sowie in zahlreichen Forschungsgebieten angewendet.

In der Gentherapie wird grundsätzlich zwischen zwei Methoden des DNA-Transfers in somatische Körperzellen unterschieden, der *ex vivo*- und der *in vivo*-Methode. Beim *ex vivo*-Gentransfer werden dem Patienten Körperzellen entnommen und in Zellkultur (*in vitro*) vermehrt. Danach erfolgt die genetische Modifikation der Zellen in Kultur mit dem Vektor, der das intakte Gen enthält [60]. Beim *in vivo* Verfahren werden die Vektoren dagegen direkt in den Körper des Patienten appliziert und gelangen so an ihren Funktionsort [60,61].

Humane Adenoviren sind 60 bis 90 nm große, doppelsträngige DNA Viren. Anders als bei Lentiviren handelt es sich bei Adenoviren um ein nicht integrierendes Vektorsystem. Die übertragene DNA liegt als Episom im Zellkern der Wirtszelle vor. Deshalb wird das Transdukt während der Zellteilung nicht repliziert, sodass es nur zu einer transienten

Transgenexpression kommt. Adenovirale Vektoren weisen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe Transduktionseffizienz auf, eignen sich zur Beimpfung zahlreicher verschiedener Zelltypen, einschließlich teilungsunfähiger Zellen, und darüber hinaus können bei der Anzucht hohe Virustiter erreicht werden [41]. Diese, in der Regel vom Serotyp 5 (Ad5) abgeleiteten Vektoren, werden einerseits zur Übertragung heterologer Gene - *in vitro* sowie *in vivo* - eingesetzt [60]. Andererseits finden sie bei Immunisierungen [62] oder in der somatischen Gentherapie Anwendung, wenn nur eine vorübergehende Expression des Zielgens gewünscht ist [60, 61].

Verglichen mit der Applikation rekombinanter Proteine weist der Gentransfer zahlreiche Vorteile auf. Er ermöglicht die Übertragung intrazellulärer Proteine, was durch rekombinante Proteine nur schwierig zu erreichen ist. Im Gegensatz zu ihren rekombinanten Pendanten sind mittels Gentransfer übertragene Proteine nicht mit fremden Antigenen kontaminiert, da sie *in situ* von der Wirtszelle selbst synthetisiert und darüber hinaus der post-translationalen Modifikation unterzogen werden. Außerdem wird durch virale Transduktion ermöglicht, die transfizierten Gene über einen längeren Zeitraum zu exprimieren und zudem das Maß der Transgenexpression zu regulieren. Abhängig von der Art der Anwendung kann die virale Transduktion im Vergleich zur Applikation rekombinanter Proteine auch aus ökonomischer Sicht vorteilhaft sein, da der Gentransfer nur einmal und darüber hinaus in einer relativ geringen Menge erfolgt [41].

Virale Vektorsysteme werden bereits seit über 20 Jahren in verschiedenen klinischen Gentherapie-Studien verwendet [61]. Ein wichtiges Sicherheitsbedenken stellt die Immunogenität der Vektoren dar, die beispielsweise in einer starken allergischen Reaktion resultieren könnte. Denn nach der Transduktion mit einem viralen Vektor werden in den Wirtszellen neben den Transgenen auch die entsprechenden viralen Proteine exprimiert, die vom Immunsystem als fremd erkannt und folglich eliminiert werden [60, 61]. Häufig ist eine wiederholte Vektorapplikation notwendig, um einen langfristigen therapeutischen Effekt zu erzielen. Aufgrund der genannten hohen Immunogenität ist eine wiederholte Applikation jedoch nur sehr begrenzt durchführbar.

Da die meisten Vektorsysteme replikationsdefizient sind, werden sie in Zelllinien vermehrt, die die fehlenden Gene des Virus komplettieren. Hier besteht theoretisch die Gefahr einer Keimbahntransmission, das heißt, dass durch homologe Rekombinationsvorgänge erneut vermehrungsfähiges Virus entstehen kann. Da bei einer Vektorapplikation *in vivo* jedoch keine komplettierenden Zellen vor Ort sind, ist die Gefahr der Infektion mit replikationsfähigem Virus als gering anzusehen [60, 61].

Darüber hinaus besteht die Gefahr, dass dies in Regionen des Genoms stattfindet, die für

Onkogene oder Tumorsuppressorgene kodieren und deren Funktion dadurch modifiziert werden könnte. Dies wird als Insertionsmutagenese bezeichnet und kann die Entstehung von Tumoren begünstigen [61].

Trotz der Risiken bieten Adenoviren für die Gentherapie große Vorteile wurden daher bereits in zahlreichen klinischen Studien angewendet [41]. Ihre Applikation stellt eine aussichtsreiche Option für die Therapie segmentaler Knochendefekte dar, wobei die Richtlinien zum Gentransfer in menschliche Körperzellen strengstens einzuhalten sind.

## 5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass die adenovirale Modifikation von hMSZ durch die simultane Transduktion von Ad.IHH und Ad.BMP-2 einen vielversprechenden Ansatz für die Stimulation der Knochenheilung liefert. Diese Erkenntnisse müssen zukünftig jedoch durch detaillierte *in vivo* Untersuchungen belegt werden.

Darüber hinaus wird die virale Transduktion zur Behandlung nicht lebensbedrohlicher Erkrankungen durchaus mit Skepsis betrachtet [63].

Adenoviren zählen zu den DNA-Viren. Deshalb kommt es selten vor, dass deren Genom in die Wirtszell-DNA integriert wird. Des Weiteren zeigt die Transgen-Expression der Adenoviren keine negativen Auswirkungen auf den Knochenheilungsprozess. Die Anwendung von Adenoviren hat einerseits den Vorteil, dass eine Produktion hoher Titer rekombinanter Vektoren möglich ist, andererseits zeigen sie eine hohe Infektiosität gegenüber vielen unterschiedlichen Zelltypen [64].

Von Nachteil ist sicherlich die hohe Antigenität der Adenoviren, die durch die Präsenz zahlreicher zirkulierender Antikörper im Organismus vieler Individuen bedingt ist. Diese Antikörper könnten die Effektivität der adenoviralen Gentherapie reduzieren. Außerdem könnte die dadurch ausgelöste Entzündungsreaktion den Heilungsprozess negativ beeinflussen [65].

Abschließend ist zu sagen, dass es gegenwärtig noch keinen Konsens über die am besten geeigneten Vektoren und Transgene gibt. Folglich besteht auf diesem Gebiet weiterhin Forschungsbedarf.

# Literaturverzeichnis

- [1] Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, and Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*, 7(10):1918–1929, 2012.
- [2] Jürgens C, Wolter D, Queitsch C, and Schultz JH. Treatment concepts and results in non-infected post-traumatic pseudarthroses of the femur and tibia. *Zentralbl Chir*, 119:706–713, 1994.
- [3] Marler JJ, Upton J, Langer R, and Vacanti JP. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 33:165–182, 1998.
- [4] Huard J, Li Y, Peng H, and Fu FH. Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gene Med*, 5:93–108, 2003.
- [5] Derubeis AR and Cancedda R. Bone marrow stromal cells (bmscs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng*, 32:160–165, 2004.
- [6] Sims NA and Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*, 19:444–451, 2008.
- [7] Manolagas SC et al. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21:115–137, 2000.
- [8] Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, and Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev*, 16:123–145, 2010.
- [9] Sethe S, Scutt A, and Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*, 5:91–116, 2006.
- [10] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, and Douglas R et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143–147, 1999.

- [11] Valtieri M and Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol*, 217:296–300, 2008.
- [12] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, and Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype and differentiation capacity and immunological features and and potential for homing. *Stem Cells*, 25:2739–2749, 2007.
- [13] Grayson WL, Frohlich M, Yeager K, Bhumiratana S, Chan ME, Cannizzaro C, Wan LQ, Liu XS, Guo XE, and Vunjak-Novakovic G. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:3299–3304, 2010.
- [14] Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, and Jaiswal N et al. Bone regeneration by implantation of purified and culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 16:155–162, 1998.
- [15] Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, and van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering. *PLoS Med*, 4:e9, 2007.
- [16] Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Kaspar D, Kreja L, Friemert B, and Claes L. Effekte mechanischer reize auf humane osteoblastäre zellen in einer dreidimensionalen kollagen-typ-i-matrix. *Orthopäde*, 33:1386–1392, 2004.
- [17] Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, and Tanihara M. Accelerated bone repair with the use of a synthetic bmp-2-derived peptide an bone-marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res*, 72-A:77–82, 2005.
- [18] Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz HN, Phillips F, Hilibrand A, Albert TJ, Wetzel T, and McCulloch JA. A pilot study evaluating the safety and efficacy of op-1 putty (rhbmp-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine*, 29:1885–1892, 2004.
- [19] Bertone AL et al. Adenoviral-mediated transfer of human bmp-6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res*, 22:1261–1270, 2004.
- [20] Wozney JM and Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res*, 346:26–37, 1998.

- [21] Canalis E et al. Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem*, 108:769–777, 2009.
- [22] Heldin CH, Miyazono K, and Ten Dijke P. Tgf- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through smad proteins. *Nature*, 390:465–471, 1997.
- [23] Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, and Roman-Roman S. Bmp-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res*, 18:1842–1853, 2003.
- [24] Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, and Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin d, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250:776 – 781, 1998.
- [25] Gautschi OP, Frey SP, and Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ journal of surgery*, 77(8):626–631, 2007.
- [26] Wang Q, Huang C, Zeng F, Xue M, and Zhang X. Activation of the hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. *Am J Pathol*, 177:3100–3111, 2010.
- [27] Ferguson CM, Mclau T, Hu D, Alpern E, and Helms JA. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann N Y Acad Sci*, 857:33–42, 1998.
- [28] Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, and Long F. Sequential roles of hedgehog and wnt signaling in osteoblast development. *Development*, 132:49–60, 2005.
- [29] Chung UI, Schipani E, McMahon AP, and Kronenberg HM. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest*, 107:295–304, 2001.
- [30] Deyo RA, Ching A, Matsen L, Martin BI, Kreuter W, Jarvik JG, Angier H, and Mirza SK. Use of bone morphogenetic proteins in spinal fusion surgery for older adults with lumbar stenosis: trends and complications and repeat surgery, and charges. *Spine*, 37:222–230, 2012.
- [31] Giannoudis PV, Kanakaris NK, Dimitriou R, Gill I, Kolimarala V, and Montgomery RJ. The synergistic effect of autograft and bmp-7 in the treatment of atrophic nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, 467:3239–3248, 2009.

- [32] Fisher DM, Wong JM, Crowley C, and Khan WS. Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: a systematic review. *Curr Stem Cell Res Ther*, 8:260–268, 2013.
- [33] McMahon AP, Ingham PW, and Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*, 53:1–114, 2003.
- [34] Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, and Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*, 20:1060–1069, 2002.
- [35] Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, and Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13(1):81–88, 1992.
- [36] Hardy S, Kitamura M, Harris-Stansil T, Dai Y, and Phipps ML. Construction of adenovirus vectors through cre-lox recombination. *J Virol*, 71(3):1842–1849, March 1997.
- [37] Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, Nöth U, Evans CH, and Ghivizzani SC. Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer. *Tissue Eng Part A*, 15:1127–1139, 2009.
- [38] Steinert AF, Weissenberger M, Kunz M, Gilbert F, Ghivizzani SC, Gobel S, Jakob F, Nöth U, and Rudert M. Indian hedgehog gene transfer is a chondrogenic inducer of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*, 14:R168, 2012.
- [39] Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001.
- [40] Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, and Vitzthum F. Investigations on dna intercalation and surface binding by sybr green i and its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, 32(12):e103–e103, 2004.
- [41] Evans CH et al. Gene delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev*, 64:1331–1340, 2012.
- [42] Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, An N Luu HH, Breyer B, and Vanichakarn P et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (bmps). *J Bone Joint Surg Am*, 85-A:1544–1552, 2003.

- [43] Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, Gallea S, Faucheu C, Mollat P, Courtois B, Bergaud B, Ramez V, and Blanchet AM et al. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J Cell Sci*, 114:2085–2094, 2001.
- [44] van der Horst G, Farih-Sips H, Lowik CW, and Karperien M. Hedgehog stimulates only osteoblastic differentiation of undifferentiated ks483 cells. *Bone*, 33:899–910, 2003.
- [45] Nakamura T, Aikawa T, Iwamoto-Enomoto M, Iwamoto M, Higuchi Y, Pacifici M, Kinto N, Yamaguchi A, Noji S, Kurisu K, and Matsuya T. Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, 237:465–469, 1997.
- [46] Porter JR, Henson A, and Papat KC. Biodegradable poly(epsilon-caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. *Biomaterials*, 30:780–788, 2009.
- [47] Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, and McMahon AP. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development*, 131:1309–1318, 2004.
- [48] Krishnan V, Ma Y, Moseley J, Geiser A, Friant S, and Frolik C. Bone anabolic effects of sonic/indian hedgehog are mediated by bmp2/4-dependent pathways in the neonatal rat metatarsal model. *Endocrinology*, 142:940–947, 2001.
- [49] Plaisant M, Fontaine C, Cousin W, Rochet N, Dani C, and Peraldi P. Activation of hedgehog signaling inhibits osteoblast differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 27:703–713, 2009.
- [50] Aberg T, Cavender A, Gaikwad JS, Bronckers AL, Wang X, Waltimo-Siren J, Thesleff I, and D’Souza RN. Phenotypic changes in dentition of runx2 homozygote-null mutant mice. *J Histochem Cytochem*, 52:131–139, 2004.
- [51] Liu TM and Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev*, 19:254–263, 2013.
- [52] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, and Karsenty G. Osf2/cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89:747–754, 1997.

- [53] Kern B, Shen J, Starbuck M, and Karsenty G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type i collagen genes. *J Biol Chem*, 276:7101–7107, 2001.
- [54] Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, and Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:1447–1451, 1976.
- [55] Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, and Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, 23:187–196, 1998.
- [56] Ganss B, Kim RH, and Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10:79–98, 1999.
- [57] Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, and Cheresch DA. Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem*, 268:9901–9907, 1993.
- [58] Zhang JH, Tang J, Wang J, Ma W, Zheng W, Yoneda T, and Chen J. Overexpression of bone sialoprotein enhances bone metastasis of human breast cancer cells in a mouse model. *Int J Oncol*, 23:1043–1048, 2003.
- [59] Goff SP and Berg P. Construction of hybrid viruses containing sv40 and  $\lambda$  phage dna segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell*, 9(4):695–705, 1976.
- [60] Thomas CE, Ehrhardt A, and Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4(5):346–358, 2003.
- [61] Robbins PD and Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 80(1):35–47, 1998.
- [62] Bassett JD, Swift SL, and Bramson JL. Optimizing vaccine-induced cd8+ t-cell immunity: focus on recombinant adenovirus vectors. *Expert review of vaccines*, 10(9):1307–1319, 2011.
- [63] Evans CH, Ghivizzani SC, and Robbins PD. Progress and prospects: genetic treatments for disorders of bones and joints. *Gene Ther*, 16:944–952, 2009.

- [64] Douglas JT et al. Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol*, 36:71–80, 2007.
- [65] Evans CH et al. Gene therapy for bone healing. *Expert Rev Mol Med*, 12:e18, 2010.

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Nöth für dieses interessante und innovative Thema bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. med. Johannes Reichert für seine engagierte Betreuung und Unterstützung. Er war stets eine große Hilfe bei der praktischen und theoretischen Umsetzung meiner Arbeit und stand mir jederzeit beratend zur Seite.

Für die Bereitstellung der rekombinanten Adenoviren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andre Steinert bedanken.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Osteologiezentrums und des wissenschaftlichen Labors für klinische Forschung der orthopädischen Universitätsklinik, König-Ludwig-Haus, auf deren Erklärungen und Hilfestellungen ich bei der Benutzung der Geräte und beim Erlernen verschiedenster Arbeitstechniken stets angewiesen war. Allen voran Herrn Dr. med. Fabian Gilbert, der mir bei der Laborarbeit bei Bedarf sofort zur Seite stand und dessen Gesellschaft im Labor stets eine Bereicherung war.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihre verständnisvolle Beratung während meiner Arbeit und die liebevolle, geistige und moralische Unterstützung während meiner Studienzeit.