

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

**In vitro Untersuchungen zur chondrogenen Differenzierung von humanen  
mesenchymalen Stammzellen in einem Kollagen I Hydrogel für den  
Gelenkknorpelersatz**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Lars Rackwitz

aus Münster

Würzburg, Januar 2007

Referent: Professor Dr. med. Jochen Eulert

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2007

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern gewidmet

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| °C              | Grad Celsius                          |
| Abb.            | Abbildung                             |
| ACT             | Autologe Chondrozyten Transplantation |
| AGN             | Aggrekan                              |
| Ak              | Antikörper                            |
| BMP             | Bone Morphogenetic Protein            |
| bzw.            | beziehungsweise                       |
| ca.             | circa                                 |
| cDNA            | komplementäre Desoxyribonucleinsäure  |
| cm              | Zentimeter                            |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid                     |
| Coll I          | Kollagen Typ I                        |
| Coll II         | Kollagen Typ II                       |
| Coll X          | Kollagen Typ X                        |
| COMP            | Cartilage Oligomeric Matrix Protein   |
| DAB             | Diaminobenzidin Peroxidase            |
| DMEM/F-12       | Dulbecco's Modified Eagle's Medium    |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                |
| dNTP            | Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat    |
| dt Primer       | desoxythymidin Primer                 |
| EDTA            | Ethylendiamintetraacetat              |
| EF-1a           | Elongationsfaktor-1alpha              |
| et al.          | et altera                             |
| FBS             | Fetales Kälberserum                   |
| ggf.            | gegebenenfalls                        |
| h               | Stunde                                |
| H/E             | Hämatoxylin/Eosin                     |
| HCL             | Salzsäure                             |
| hMSZ            | humane mesenchymale Stammzellen       |

|          |  |
|----------|--|
| HPLC     | Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie       |
| ITS      | Insulin Transferrin Selenit                      |
| kDa      | kilo Dalton                                      |
| Koll I   | Kollagen Typ I                                   |
| Koll II  | Kollagen Typ II                                  |
| Koll III | Kollagen Typ III                                 |
| Koll X   | Kollagen Typ X                                   |
| Koll XI  | Kollagen Typ IX                                  |
| Konz.    | Konzentration                                    |
| min      | Minute   |
| ml       | Milliliter                                       |
| mm       | Millimeter                                       |
| MSC      | mesenchymal stem cells                           |
| MSZ      | Mesenchymale Stammzelle(n)                       |
| NaCl     | Natriumchlorid                                   |
| PBS      | Phosphate Buffered Saline                        |
| RNA      | Ribonukleinsäure                                 |
| RT-PCR   | reverse transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion |
| sek      | Sekunde(n)                                       |
| SDS      | Natrium Dodekyl Sulfat                           |
| TGF      | Transforming Growth Factor                       |
| Tris     | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                   |
| Tab.     | Tabelle  |
| U/min    | Umdrehungen pro Minute                           |
| z.B.     | zum Beispiel                                     |
| µl       | Mikroliter                                       |
| mM       | milli Mol  |
| U/µl     | Units/Mikroliter                                 |
| UV       | Ultraviolett                                     |
| pmol/µl  | pikomol/Mikroliter                               |
| bp       | Basenpaar  |
| IU       | Internationale Einheiten                         |

## Inhaltsverzeichnis

|   | <b>Seite</b> |
|---|--------------|
| <b>1. Einleitung</b>                                    | <b>1</b>     |
| 1.1 Biologie des Gelenkknorpels                         | 1            |
| 1.2 Gelenkknorpeldefekte und Gelenkknorpelheilung       | 4            |
| 1.3 Strategien der Gelenkknorpelrekonstruktion          | 7            |
| 1.4 Mesenchymale Stammzellen                            | 12           |
| 1.5 Chondrogene Differenzierung                         | 13           |
| 1.6 Tissue Engineering                                  | 16           |
| 1.7 Kollagen Typ I und Hydrogel                         | 18           |
| 1.8 Cartilage Regeneration System (CaReS <sup>®</sup> ) | 21           |
| 1.9 Fragestellung                                       | 22           |
| <br>  |              |
| <b>2. Material und Methoden</b>                         | <b>25</b>    |
| 2.1 Gewinnung von MSZ aus Knochenmark                   | 25           |
| 2.2 Herstellung der MSZ-Kollagen Konstrukte             | 26           |
| 2.3. RT-PCR   | 27           |
| 2.3.1 Aufbereitung der MSZ-Kollagen Konstrukte          | 27           |
| 2.3.2 RNA-Isolierung und Aufreinigung                   | 28           |
| 2.3.3 cDNA-Synthese und Amplifikation mittels RT-PCR    | 28           |
| 2.4 Gel-Elektrophorese                                  | 30           |
| 2.5 Semiquantitative Densitometrie                      | 31           |
| 2.6 Apoptose und Zellvitalitäts Assay                   | 32           |
| 2.7 Histologie  | 32           |
| 2.7.1 Anfertigen der histologischen Schnitte            | 32           |
| 2.7.2 Histochemische Färbungen                          | 33           |
| 2.6.3 Immunhistochemische Färbungen                     | 34           |
| 2.8 Verwendete Lösungen und Ansätze                     | 37           |
| 2.9 Verwendete Geräte und Materialien                   | 40           |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>42</b> |
| 3.1       | Stammzellkultur  | 42        |
| 3.2       | MSZ-Kollagen Hydrogele                                   | 42        |
| 3.3       | Apoptose und Zellvitalität                               | 43        |
| 3.4       | Genexpressionmuster der RT-PCR Analyse                   | 45        |
| 3.5       | Semiquantitative Densitometrie                           | 47        |
| 3.6       | Histochemische- und Immunhistochemische Färbungen        | 49        |
|           | 3.6.1 Hämatoxylin/Eosin und Alzian Blau Färbung          | 49        |
|           | 3.6.2 Anti-Kollagen Typ II und X Immunhistochemie        | 51        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>54</b> |
| 4.1       | Methodische Überlegungen                                 | 54        |
| 4.2       | Zellvermittelte Kontraktion, Vitalität und Proliferation | 55        |
| 4.3       | Chondrogene Differenzierung von MSZ                      | 57        |
| 4.4       | Zukunftsperspektiven                                     | 61        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                   | <b>64</b> |
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>                              | <b>67</b> |