

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 ₂	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

	Seite
1. Einleitung	1
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 [®])	21
1.9 Fragestellung	22
2. Material und Methoden	25
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

3.	Ergebnisse	42
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
4.	Diskussion	54
4.1	Methodische Überlegungen	54
4.2	Zellvermittelte Kontraktion, Vitalität und Proliferation	55
4.3	Chondrogene Differenzierung von MSZ	57
4.4	Zukunftsperspektiven	61
5.	Zusammenfassung	64
6.	Literaturverzeichnis	67