

**Differenzierung humaner mesenchymaler
Stammzellen zu Chondrozyten**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Alexei Slobodianski
aus Almaty, Kasachstan**

**Hamburg
2006**

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. U. BEISIEGEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. D. HANELT
Tag der Disputation: 29. September 2006

Hamburg, den 17. September 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	1
1	Einleitung	3
1.1	<i>Tissue-Engineering</i> , neue Perspektiven zur Therapie von Knorpeldefekten	3
1.2	Struktur und Funktion des Knorpels	4
1.2.1	Struktur des Knorpels und seine besonderen Eigenschaften	4
1.2.2	Architektur und Biomechanik des Knorpelgewebes	6
1.2.3	Die Entwicklung des Knorpels	7
1.3	<i>Tissue Engineering</i> von Knorpel <i>in vitro</i> durch Aggregation adulter Chondrozyten	9
1.4	<i>Tissue Engineering</i> von Knorpel <i>in vitro</i> durch Stimulierung der embryonalen Chondrogenese	10
1.4.1	Allgemeine Eigenschaften von Stammzellen	10
1.4.2	Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen	11
1.4.3	Die Heterogenität der im humanen Knochenmark vorkommenden MSCs	11
1.4.4	Methoden zur Gewinnung einer für die <i>in vitro</i> Chondrogenese geeigneten Zellpopulation aus dem Knochenmark	13
1.4.5	Methoden zur Identifizierung verschiedener Populationen von hMSCs	14
1.4.6	Die Pellet-Kultur als Differenzierungsmodell	14
1.4.7	Grenzen der Pellet-Kultur als Differenzierungsmodell	15
1.5	Ein alternatives Differenzierungsmodell für mesenchymale Stammzellen	15
1.5.1	Das Drei-Phasen-Modell	16
1.5.2	Die Alginatkultur-Technik	17
1.6	Das Ziel dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Zellkultur	20
2.1.1	Gewinnung und Isolierung der Stammzellen und Chondrozyten	21
2.1.2	Zellpräparationen	22
2.1.3	Zellzählung	23
2.2	Proliferation der Zellen	23
2.2.1	Wachstumsverhalten	24
2.3	Differenzierung der Zellen <i>in vitro</i>	25
2.3.1	Chondrogenese Zwei-Phasen Modell	25
2.3.2	Chondrogenese Drei-Phasen Modell	26
2.3.3	Adipogene Differenzierung	29
2.3.4	Osteogene Differenzierung	29
2.4	Molekularbiologische Analysen	30
2.4.1	RNA Isolierung	30
2.4.2	cDNA Synthese	31
2.4.3	DNA-Auftrennung im Agarosegel	32
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.4.5	Quantitative PCR (qPCR)	34
2.5	Proteinanalysen	36
2.5.1	Histologische Schnitte	36
2.5.2	Immunfärbung	37
2.5.3	Semiquantitative Kollagen-Bestimmung (PAGE, Western Blot)	38
2.5.4	Erstellung der Cytospins	40
2.5.5	Fluoreszenzmarkierung von Pseudochondronen (4)	40

2.6	Sonstige Techniken	41
2.6.1	DNA-Bestimmung	41
2.6.2	GAG-Bestimmung	42
2.6.3	Dimethylmethylenblau-Färbung (DMMB)	42
2.6.4	Alcian – Blau Färbung	43
2.6.5	Oil Red O Färbung (Adipozytenfärbung)	43
2.6.6	Von Kossa Färbung (Nachweis der osteogenen Mineralisierung)	44
2.6.7	Durchflusscytometrische Analyse	44
2.6.8	Quantitative Auswertung der gefärbten Cytospins	45
2.7	Analytik	46
2.7.1	GAG/DNA-Analyse (G/D-Verhältnis)	46
2.7.2	Statistische Auswertung und Bioinformatik	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Auftrennung der Zellen über den Ficoll-Gradienten	49
3.1.1	Abtrennung der hämatopoetischen Zellen	49
3.1.2	Die Heterogenität, der nach der Ficoll-Gradienten-Auftrennung gewonnenen Zellpopulation der hMSC	51
3.1.3	Multipotenz der gewonnenen Zellen	53
3.2	Proliferationsphase – <i>in vitro</i> Vermehrung	55
3.2.1	Aussaatdichte und Vermehrungsfaktor	55
3.2.2	Abhängigkeit der Morphologie der Zellen von der Aussaatdichte	56
3.2.3	Einfluss mitogener Wachstumsfaktoren auf die Proliferationsrate	58
3.2.4	Durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach der Proliferationsphase	59
3.2.5	Wirkung mitogener Wachstumsfaktoren auf die Synthese von Glykosaminoglykanen in Pellet-Kultur ohne und mit Differenzierung	60
3.2.6	Die Morphologie der Zellen, die für die chondrogene Differenzierung eingesetzt wurden	61
3.3	In Alginat-Gel eingebettete hMSCs als Differenzierungsmodell	62
3.3.1	GAG-Synthese in Pellet-Kulturen mit und ohne vorherige Differenzierung in Alginat-Kultur	62
3.3.2	Optimierung der Bedingungen für die Differenzierung in der Alginat-Kultur	63
3.3.3	Identifizierung der in der Alginat-Kultur gebildeten Chondrozyten	66
3.3.4	Die Quantifizierung der Anzahl der in der Alginat-Kultur gebildeten Chondrone	69
3.3.5	Wirkung von Dexamethason bei der Differenzierung der eingesetzten hMSCs in der Alginat-Kultur	70
3.3.6	Effekt von TGF- β 3 auf die Differenzierung der eingesetzten hMSCs in der Alginat-Kultur	72
3.3.7	Wirkung von IGF-I auf die Differenzierung der eingesetzten hMSCs in der Alginat-Kultur	73
3.4	Die Matrixbildung in Pellet-Kulturen mit und ohne Differenzierung der hMSCs in Alginat-Kultur	74
3.4.1	Matrixbildung	74
3.4.2	Der Einfluss der chondrogenen Differenzierung in der Alginat-Kultur auf die Genexpression in der Pellet-Kultur	77
3.5	Optimierung der Kulturbedingungen für die Matrixbildung in der Pellet-Kultur	78
3.5.1	Effekte von Dexamethason, TGF- β 3 und IGF-I in der Pellet-Kultur auf die Matrixsynthese	78
3.5.2	Effekte von Dexamethason, TGF- β 3 und IGF-1 in der Pellet-Kultur auf die Genexpression	81
3.5.3	Abhängigkeit des Chondrogenese-Potenzials der <i>in vitro</i> vermehrten	83

	hMSCs vom Vermehrungsfaktor in der Proliferationsphase	
3.5.4	Vergleich des in der Pellet-Kultur gebildeten Knorpelgewebes mit nativem, humanem Knorpel	85
4	Diskussion	89
4.1	Die Gewinnung der Zellen	89
4.2	Proliferation	90
4.2.1	Die Heterogenität der Zellpopulation	90
4.2.2	Die Bedeutung einer hohen Proliferationsrate bei der Anreicherung der hMSCs	92
4.3	Die Chondrogene Differenzierung von hMSCs	93
4.3.1	Die Bedeutung von Wachstumsfaktoren	93
4.3.2	Die Pellet-Kultur als Differenzierungsmodell	95
4.3.3	Das Alginat-Gel als Differenzierungsmodell	96
4.3.4	Die Matrixbildung in der Pellet-Kultur	101
	Zusammenfassung	104
	Abbildungsverzeichnis	105
	Literatur	107
	Danksagung	121
	Anhang	122

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
AP	Alkalische Phosphatase
AsAP/C	Ascorbinsäure-2-Phosphat + Cystein
bFGF, FGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium ion
CaCl ²	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation (CD-Molekül)
cDNAs	copy Desoxyribonucleinsäure
Col.	Kollagen
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMMB	1,9-Dimethyl-Methlenblau-Chlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA dsDNA	(doppel-strängige) Desoxyribonucleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FS	Forward scatter
g	Erdbeschleunigung
G/D-Verhältnis,	GAG zu DNA - Verhältnis
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
hCh	humane Chondrozytenlinie
HD-Kultur	high-density Kultur
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HS	Humanserum
IGF-I, IGF, I	insulin-like growth-factor I
IgG	Immunglobulin G
JAA	Jodacetamid
K	Kontrolle
min	Minute
MMP	Matrix Metalloproteinase

MNC	mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Stichproben
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
O ₂	Sauerstoff
p	Signifikanzniveau
P/S	Penicillin / Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reverse Transkriptase PCR
PDGF-BB,	platelet derived growth factor-BB
PE	R-Phycoerythrin
PG	Proteoglykane
PGA	poly-glycolic acid
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
mono/poly	monoklonale bzw. polyklonale Antikörper
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
qPCR	quantitative Reverse Transkriptase PCR
R ²	Regressionskoeffizient
rpm	Rotations per Minute
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
sec	Sekunde
Sox 9	SRY (sex determining region Y)
SS	Site Scatter
Stabw	Standardabweichung
STRO-1	stromal cell surface marker
SYBR Green	Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von dsDNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β, TGF,	transforming growth factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
v/v	Volumen/Volumen
vs.	versus
w/v	Masse/Volumen
WB	Western Blot
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 *Tissue-Engineering*, neue Perspektiven zur Therapie von Knorpeldefekten

Eine zufrieden stellende Behandlung von Knorpelschäden in den Gelenkflächen des Menschen gehört nach wie vor zu den ungelösten Problemen der Medizin. Es wird geschätzt, dass mehr als 80 Prozent der über 50-jährigen unter einem zum Teil sehr schmerzhaften Knorpelverschleiß leiden (Kowalewski 2005). Aber nicht nur mit zunehmendem Alter verliert der Knorpel seine optimalen biomechanischen Eigenschaften, auch immer mehr aktive, junge Leute sind betroffen. Bei ihnen sind hauptsächlich mechanische Überlastungen und Sportverletzungen die Ursache für Schäden, die nicht mehr spontan heilen und mit der Zeit zur Entstehung permanenter Knorpeldefekte führen. Die Folge ist eine fortschreitende schmerzhaft Degenerierung des Gewebes, die schließlich zur Gelenkarthrose führt. Die Ursache ist die mangelnde postnatale Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes (Buckwalter and Mankin, 1998). Ohne wirksame therapeutische Behandlung werden solche Verletzungen nur durch die Bildung mechanisch minderwertigen Narbengewebes geschlossen. Man schätzt die jährlichen Kosten für die Behandlung der Arthrose in Deutschland auf ca. 7 Milliarden Euro. (Maetzel, 2004). Eine Möglichkeit zur Heilung solcher Knorpelschäden liegt im Ersatz des defekten Gewebes durch intakte Gelenkflächen-Implantate, die man mit Hilfe des *Tissue Engineering* herzustellen hofft. Bisher angewandte klinische Therapieverfahren zur Knorpeldefektreparatur wie zum Beispiel das *Shaving* (Messner 1996), subchondrale Abrasionsarthroplastik (Johnson, 2001; Singh et al., 1991) oder autologe Chondrozytentransplantation (Brittberg et al., 2003) erreichen nur eine Defektauffüllung mit biomechanisch nicht kompetentem Knorpel. Ein anderes chirurgisches Verfahren stellt die so genannte „Mosaikplastik“ dar. Bei dieser Methode wird osteochondraler Zylinder kleinen Durchmessers mosaikförmig in einen Knorpeldefekt eingestanz. Diese Methode bleibt aber auf kleine Defekte beschränkt (Hangody et al., 2001). Die unvollständige Defektdeckung und das Setzen neuer Defekten durch die Entnahme an unbelasteter Stelle des Knorpels sind ständige Diskussionspunkte (Jubel et al., 2002; Hangody and Fules, 2003). Deswegen gehört die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung von Gelenkflächenimplantanten aus körpereigenen Zellen ohne Schädigung an anderer Stelle zur den zentralen Zielen des *Tissue Engineering*.

1.2 Struktur und Funktion des Knorpels

1.2.1 Struktur des Knorpels und seine besonderen Eigenschaften

Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Knorpel: Faser-, elastischen und hyalinen Knorpel. Der Faserknorpel besteht aus miteinander verflochtenen Kollagen-Faserbündeln, die ihm eine besondere Zugfestigkeit verleihen. Faserknorpel findet man in den Menisken, der Symphyse und in den Bandscheiben. Der elastische Knorpel, den man im äußeren Gehörgang und in der Ohrmuschel findet, enthält neben festen Kollagenfasern noch besondere, elastische Faser. Die dritte Knorpelart ist der hyaline Gelenknorpel. Er ermöglicht bei statischer und dynamischer Belastung gleichermaßen eine effektive Stossdämpfung durch Verteilung der einwirkenden Kräfte auf eine größere Fläche sowie ein nahezu reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Gelenkflächen. Während der Skelettbildung und beim Wachstum liefert der hyaline Knorpel die Wachstumsmatrix für das knöcherne Skelett.

Da gerade die Herstellung des hyalinen Knorpels mit großen Hoffnungen für die Therapie von Gelenkflächenschäden verbunden ist, beschäftigt sich diese Arbeit im Weiteren nur mit dieser besonderen Art des Knorpels. Gelenknorpel kann bis zu 5 mm dick werden, z.B. hinter der Kniescheibe (Eckstein et al., 2001). Im Allgemeinen gilt dabei, je stärker die Belastung ist, desto dicker wird der Knorpel.

Der hyaline Knorpel besteht im Wesentlichen aus Wasser (Anteil ca. 70-80%;), extrazellulärer Matrix (ECM) und den Chondrozyten (Mankin and Thrasher, 1975). Im Vergleich zu anderen Geweben ist der Anteil an Zellen im hyalinen Knorpel mit 1-10% recht niedrig (Carney and Muir, 1988). Gelenkflächenknorpel kann man sich aufgebaut aus Schichten mit unterschiedlichen Funktionen vorstellen. In der Abbildung 1 ist dies schematisch dargestellt. Betrachtet man den dargestellten Querschnitt von oben (Knorpeloberfläche) nach unten (Knochenoberfläche), so wird zunächst die Tangentialzone, auch Perichondrium genannt, sichtbar, welche Knorpeloberfläche bildet. Es folgt die mittlere Zone (Transitionalzone), die tiefe Zone (Radialzone) und die kalzifizierte Mineralisierungszone, welche den Übergang zum subchondralen Knochen darstellt (Pullig et al., 2001).

Die ECM besteht im Wesentlichen aus zwei Hauptbestandteilen, nämlich den je nach Schicht variierenden Glykosaminoglykanen (Chondroitinsulfat und Keratansulfat) und den Kollagen vom Typ II, IX und XI. Die Kollagen-Typen I und X, kommen im hyalinen Knorpel dagegen nur marginal vor. Kollagen Typ I findet sich nur in der obersten dünnen Schicht des Knorpels, welche für die besondere Festigkeit gegenüber tangentialer Belastung verantwortlich ist (Eyre et al., 1987; Mandler et al., 1989). Beim Typ X handelt es sich um ein Ca^{++} -bindendes Protein, das nur von den so genannten terminal differenzierten oder hypotrophen Chondrozyten in der Nähe der Grenzfläche zum

Knochen gebildet wird (Binette et al., 1998). Sein Anteil am Gesamt-Kollagen ist im hyalinen Knorpel sehr klein, nimmt aber bei fortschreitender Arthrose zu (Stephens et al., 1992; Walker et al., 1995).

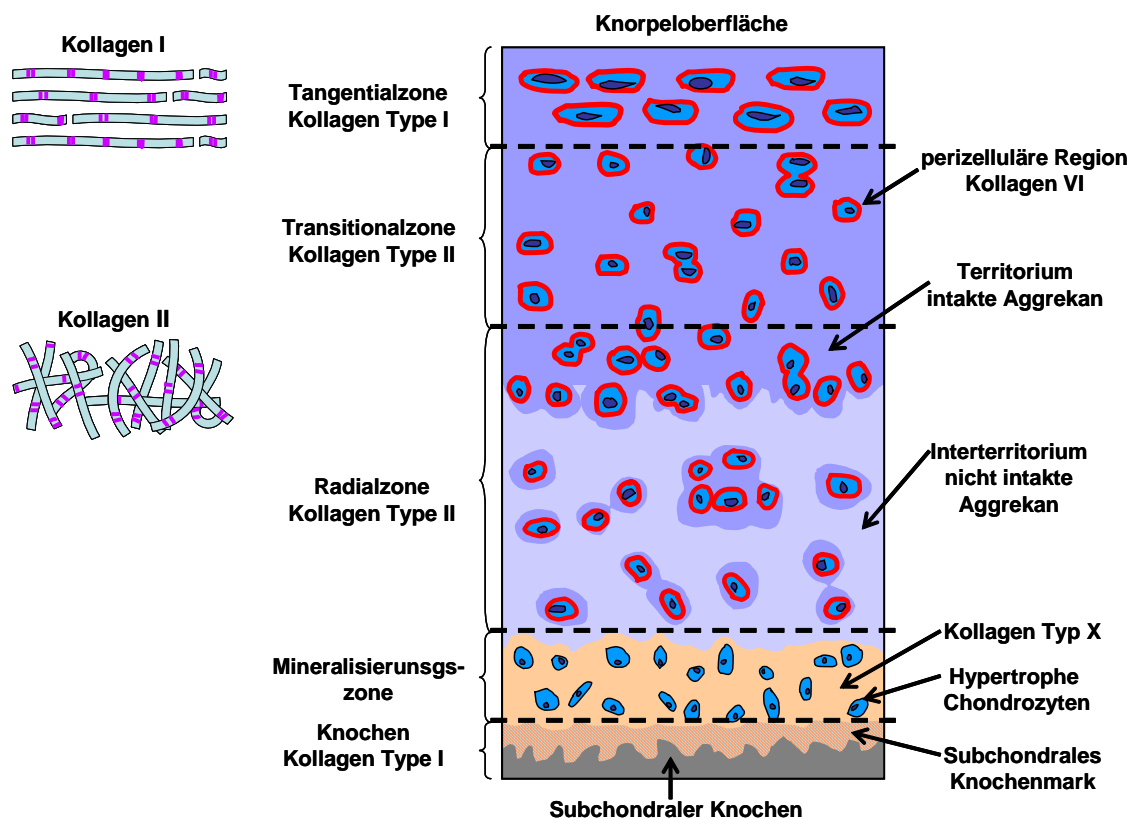


Abbildung 1: Eine schematische Darstellung des senkrechten Längsschnittes des Gelenkknorpels

Gelenkknorpel enthält eine Matrix aus Kollagenen und Proteoglykanen wie andere hyaline Knorpel, ist aber nicht homogen strukturiert, sondern aus verschiedenen Schichten aufgebaut. Die Darstellung ist modifiziert nach Koopman (Koopman WJ, 2000).

Mit der Tiefe des Knorpels ändern sich die Ausrichtung der Knorpelfasern und der Anteil an Flüssigkeit, Proteoglykanen und an den Kollagen-Fasern. In der Oberfläch-Zone sind die Kollagenfibrillen tangential zur Knorpeloberfläche orientiert (Clark, 1991; Hunziker et al., 2002) und der Kollagengehalt ist am höchsten (Poole et al., 1996). In der mittleren Zone (Transitionalzone) weisen die Kollagenfibrillen keine Vorzugsrichtung auf, während sie in der tiefen Radialzone annähernd senkrecht in die kalzifizierte Zone einstrahlen (Hunziker et al., 2002; Venn, 1978).

Knorpelgewebe zeigt im Vergleich zu anderen Geweben einige Besonderheiten: Es ist aus nur einem Zelltyp aufgebaut und ist weder innerviert noch vaskularisiert. Die Ernährung erfolgt ausschließlich durch Diffusion aus dem umgebenden Gewebe (Mankin, 1982). Die Chondrozyten finden sich in der ECM in spezielle Kapseln eingebettet, die so

genannten Chondronen, an dessen Aufbau Kollagen Typ VI beteiligt ist (Otte P 2001). In welcher Weise die Chondrone an der Regulierung des Matrix-Stoffwechsels beteiligt sind, ist noch nicht vollständig verstanden. Ein vereinfachtes Schema der Chondrone ist in der Abbildung 2 zu sehen.

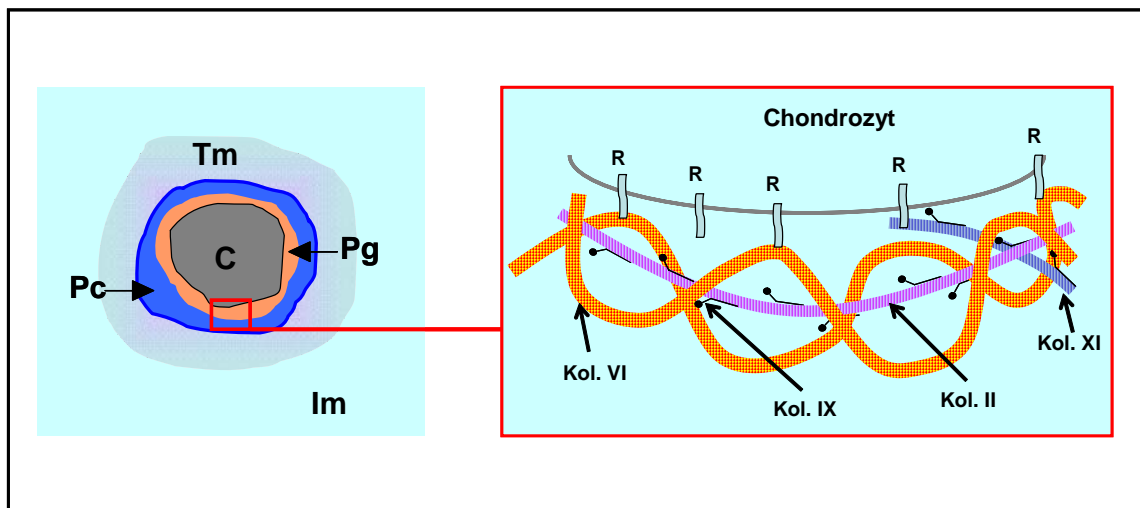


Abbildung 2: Die Struktur des Chondrons. Die schematische Darstellung

Die Chondrozyten werden unmittelbar von einer Knorpelkapsel umgeben. Zusammen mit den Chondrozyten wird dieser nach außen angrenzende Knorpelhof Chondron genannt. - C - Chondrozyt; Pg - pericelluläres Glykocalyx; Pc - pericelluläre Kapsel; Tm - Territorialmatrix; Im - interterritoriale Matrix; R - Rezeptoren (z. B. Anchorin CII oder NG-2 Rezeptor); Kol. II - Kollagen Typ II; Kol. VI - Kollagen Typ VI; Kol. IX - Kollagen Typ IX; Kol. XI - Kollagen Typ XI. Die Darstellung ist modifiziert nach Poole (Poole et al., 1992)

1.2.2 Architektur und Biomechanik des Knorpelgewebes

Die besonderen biomechanischen Leistungen des hyalinen Knorpels erklärt man sich heute nach dem Prinzip des Faser - verstärkten Werkstoffes. Die Fasern werden von quervernetzten Kollagen-Fibrillen gebildet, der Werkstoff aus stark negativ geladenen Glykosaminoglykanen (Chondroitinsulfat und Keratansulfat) und Hyaluronsäure. Letztere bilden mit Proteoglykanen, vor allem Aggrekan, sehr große Komplexe, die wegen ihrer starken Tendenz zur Wasserbindung einen sehr hohen endosmotischen Quellungsdruck erzeugen. Ohne Begrenzung durch das dreidimensionale Kollagenfaser - Netzwerk würde der Einstrom von Wasser zu einem fünfmal größeren Quellungsvolumen führen. Der Quellungsdruck von 0,1- 0,2 Mpa setzt die Fibrillen unter eine entsprechend hohe Zugspannung (Katz et al., 1986; Maroudas et al., 1980; Schneiderman et al., 1986). Das Kollagenfaser-Netzwerk gewinnt seine hohe Zugfestigkeit aus der Quervernetzung, an der die beiden Kollagentypen IX und XI beteiligt sind (Diab et al., 1996; Mandler et al., 1989). In der Abbildung 3 ist der Aufbau eines typischen Proteoglykan-Komplexes schematisch wiedergegeben.

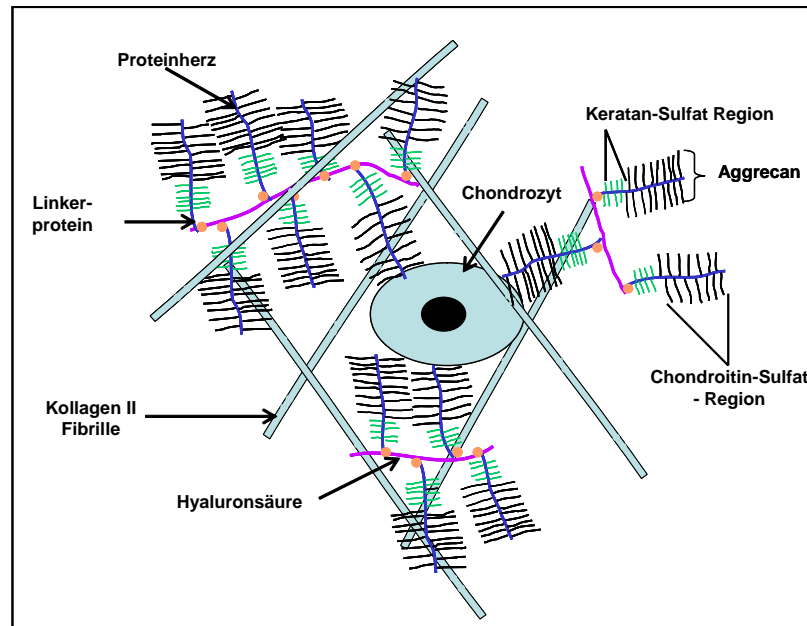


Abbildung 3: Molekularer Aufbau des Knorpels

Die extrazelluläre Matrix (ECM) des hyalinen Knorpels besteht aus einem 2-Komponenten-System: langen quergestreiften Fibrillen, die im Wesentlichen aus Kollagen Typ II bestehen und der extrafibrillären Matrix, die sich hauptsächlich aus Proteoglykan-Aggregaten zusammensetzt.

1.2.3 Die Entwicklung des Knorpels

Die Entstehung des Knorpelgewebes, die Chondrogenese, ist ein komplexer Prozess, der im Rahmen der Embryogenese zur Entwicklung des Skelettsystems führt. Sie beginnt mit der Proliferation und Kondensation mesenchymaler Stammzellen (MSCs) (Goldring et al., 2006; Tacchetti et al., 1992). Der Ablauf der einzelnen Phasen wird zwar schon seit 1925 untersucht (Fell, 1925), ist jedoch in seinen Einzelheiten noch nicht vollständig nachvollzogen (Cancedda et al., 2000). Man nimmt an, dass mesenchymal-epitheliale Zellinteraktionen zu Beginn eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Knorpelgewebes spielen (Tuan, 2004). Zu diesem Zeitpunkt initiieren morphogene Proteine (BMPs=Bone Morphogenetic Proteins) die Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 (Healy et al., 1999). Sox9 ist auf regulatorischer Ebene offenbar von zentraler Bedeutung für den Ablauf der gesamten Chondrogenese, da seine Expression vom Zustand der undifferenzierten, mesenchymalen Zelle bis zum Übergang zum prähypertrophen Zustand beobachtet wird (Lefebvre and Smits, 2005). Er reguliert direkt die Expression der Gene für Kollagen Typ II, Typ XI und für Aggrekan (Bridgewater et al., 1998; Liu et al., 2000; Sekiya et al., 2000). Nach Beginn der Kondensation der mesenchymalen Zellen entstehen im Zentrum zunächst Prächondrozyten. Gleichzeitig wird erstmalig die Expression von Kollagen Typ II beobachtet (Abb.4) während die Expression der Marker von undifferenzierten Zellen abnimmt (Lefebvre and Smits, 2005; Zhao et al., 1997). Die

Weiterentwicklung der Prächondrozyten zu frühen Chondroblasten geht mit einem Anstieg der Zellproliferation und der Matrixproduktion einher. Die Zellen bilden verstärkt Kollagen Typ II und Aggrekan. Link-Protein, Kollagen Typ IX und Typ XI werden erstmals nachweisbar (Lefebvre and Smits, 2005). In der nächsten Phase proliferieren die Zellen weiter, um schließlich zu reifen Chondrozyten auszudifferenzieren. Die Abbildung 4 zeigt eine Übersicht, bei der die genannten Marker den entsprechenden Entwicklungsstufen zugeordnet sind.

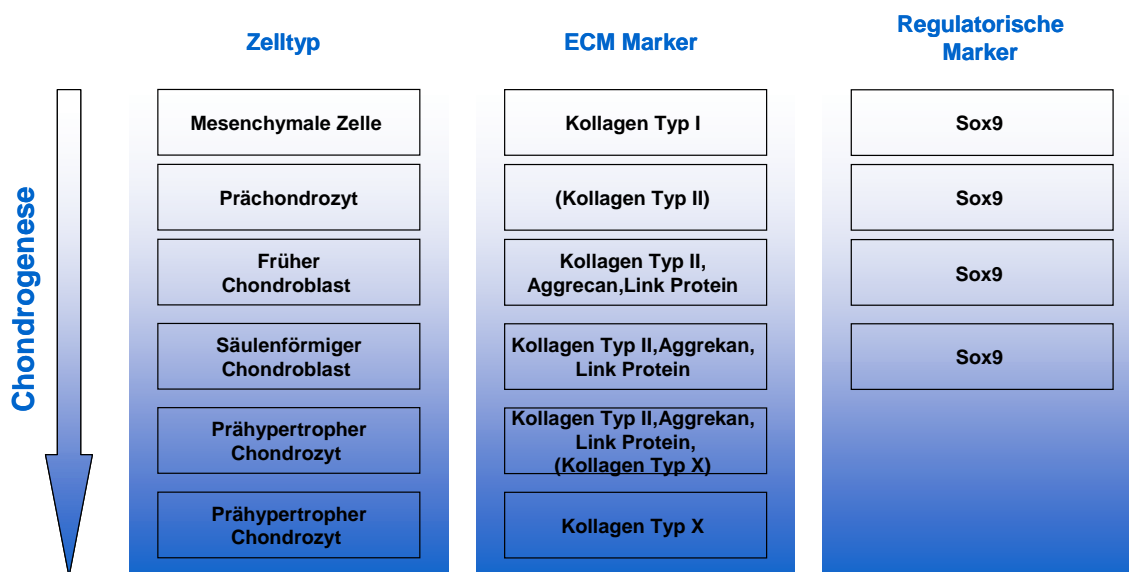


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung einzelner Schritte der Chondrogenese mit den wichtigsten Markerproteinen

Die Darstellung ist modifiziert nach Lefebvre (Lefebvre and Smits, 2005).

Während der Proliferation wird eine Avaskularisierung des Gewebes beobachtet, was Voraussetzung zur Bildung der Knorpel-spezifischen Matrix ist (Yin and Pacifici 2001). Die Proliferation kommt erst beim Übergang zum prähypertropen Chondrozyten zum Stillstand. Bei der nun einsetzenden Knochenentwicklung durchwandern die Zellen die prähypertrophe und hypertrophe Entwicklungsstufe. Sie enthalten anfangs noch mRNA für Aggrekan und Kollagen Typ II, doch wird nun zunehmend mehr Kollagen Typ X produziert. Dabei nehmen die Chondrozyten stark an Größe zu und bauen eine Matrix für die später einwandernden Osteoblasten und die folgende Mineralisierung auf. Bei den in der Gelenkfläche liegenden Chondrozyten (artikuläre Chondrozyten) wird die Hypertrophierung verhindert. Sie erhalten ihren differenzierten Phänotyp, welche die Voraussetzung für die Bildung des artikulären Knorpelgewebes ist (Goldring et al., 2006). Die permanente Erhaltung des Differenzierungsstatus der artikulären Chondrozyten wird durch verschiedene Faktoren ermöglicht. Hier spielt das in einem avaskulären Gewebe erniedrigte Sauerstoffgehalt eine Rolle, daneben aber vor allem einige

Wachstumsfaktoren und die mechanische Stimulation - - Mechanotransduktion (Szafranski et al., 2004). Zu den beteiligten Wachstumsfaktoren zählen der *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) und der *Insulin-like Growth Factor I* (IGF-I) (Roark and Greer, 1994; Wang et al., 1995). IGF-I steigert die Matrixbiosynthese und erhöht die mitogene Aktivität der Chondrozyten. Gleichzeitig hemmt er den Matrixabbau. Außerdem ist er bei akuten Knorpeldefekten und in osteoarthritischen Gelenken in höheren Konzentrationen nachgewiesen worden (De Ceuninck et al., 2004; Schmidt et al., 2006; Trippel, 1995; van Susante et al., 2000). TGF-β1 steigert die Produktion von großen, anionischen Proteoglykanen und ist in der Synovialflüssigkeit von immobilisierten Knien hochreguliert (Morales 1991; Nixon et al. 1998; Okazaki et al. 2001). Glucocorticoide haben eine indirekte Wirkung. Sie fördern weder die Chondrogenese noch die Bildung und Erhaltung des Gelenkknorpels direkt (Li et al., 2006). Allerdings scheint die Präsenz dieses Hormons in einer frühen Phase der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen essentiell zu sein (Sekiya et al., 2002). Bekannt ist darüber hinaus, dass Dexamethason auch die Migrations- und Adhäsionseigenschaften der Zellen beeinflusst (Frosch et al., 2002), was sich sowohl in der Zellmorphologie als auch im Wachstumsmuster widerspiegelt.

1.3 Tissue Engineering von Knorpel *in vitro* durch Aggregation adulter Chondrozyten

Die Erkenntnisse über die Chondrogenese haben schon früh zur Hoffnung Anlass gegeben, autologen Knorpel durch Simulierung der Chondrogenese *in vitro* für die Therapie von Gelenkflächenschäden herstellen zu können (Solursh, 1988). Die Vielzahl der gemachten Ansätze lässt sich prinzipiell in zwei Gruppen einteilen, solche, die die Gewebebildung durch Aggregation adulter Chondrozyten aus der Gelenkfläche stimulieren wollen und solche, die sie durch Kondensation mesenchymaler Stammzellen erreichen möchten. Beide Verfahren haben ihre spezifischen Vor- und Nachteile.

Methode zur Gewinnung primärer Chondrozyten aus Biopsiematerial vom Gelenkflächenknorpel verschiedener Tiermodelle und vom Menschen sind seit langen bekannt (Grande et al., 1999). Es wurde schon früh gezeigt, dass solche Chondrozyten noch die besondere Fähigkeit aufweisen, bei intensiven Zell-Zell-Kontakten mit der Bildung einer Knorpel-ähnlichen Matrix zu beginnen (Kim et al., 1994). Praktisch wurde dies sehr einfach durch Sedimentieren zu einer so genannten Pellet-Kultur (micromass culture) erreicht. Der entscheidende Nachteil der Methode besteht darin, dass für eine denkbare therapeutische Anwendung dieser Methode wesentlich mehr Zellen benötigt werden, als aus Biopsien gewonnen werden können. Denn bisher sind alle Versuche gescheitert, primäre Chondrozyten unter Erhalt ihres differenzierten Phänotyps effektiv *in*

in vitro zu vermehren (Benya and Shaffer, 1982; Goessler et al., 2005; Yu et al., 2006). Eine effektive Vermehrung ist unter verschiedenen Bedingungen möglich, jedoch nicht ohne die Zellen gleichzeitig zu de-differenzieren. Auf molekularer Ebene wird als Folge dieser Dedifferenzierung die zunehmende Bildung des Kollagens Typ I beobachtet, welches anders als das Kollagen Typ II nicht in der Lage ist, dreidimensionale Kollagenfasern mit den benötigten biomechanischen Eigenschaften zu bilden. Inzwischen werden zwar verschiedene Mechanismen diskutiert, die für die Dedifferenzierung von Chondrozyten in der Vermehrungsphase verantwortlich sein könnten (Shakibaei et al., 1995), so der Verlust des Kontaktes zwischen Chondrozyten und Matrix (Grundmann et al., 1980; Schmal et al., 2006), die Zellreifung (Chacko et al., 1969), das Altern der Zellen (Moskalewski et al., 1979) oder auch die Kontamination mit Fibroblasten ((Norby et al., 1977)). Doch Methoden zur Re-differenzierung stehen bisher nur für verschiedene Tiermodelle zur Verfügung nicht aber für den Menschen (Benya and Shaffer, 1982; Hauselmann et al., 1992; Nagel-Heyer et al., 2006).

1.4 Tissue Engineering von Knorpel *in vitro* durch Stimulierung der embryonalen Chondrogenese

Der zweite Ansatz zur Heilung von Knorpelschäden basiert auf dem Prozess der Kondensation mesenchymaler Stammzellen während der Chondrogenese.

1.4.1 Allgemeine Eigenschaften von Stammzellen

Bei der mesenchymalen Stammzelle handelt es sich zwar um Zelle mit der Fähigkeit, sich zu teilen und in unterschiedliche Zelltypen auszureifen, doch muss sie von der Embryonalen Stammzelle unterschieden werden, die allein ein maximales Potenzial zur Selbstreplikation und ein unbegrenztes Differenzierungspotential besitzt. Bis zum 8-Zell-Stadium, beim Menschen etwa bis zum dritten Tag nach der Befruchtung, bezeichnet man diese Zellen als totipotent, weil sich jede der Zellen einzeln zu einem vollständigen Individuum entwickeln lassen. Danach werden die Zellen als pluripotent bezeichnet: Sie können sich zwar noch unbegrenzt durch Zellteilung vermehren und auch noch jeden der rund 210 Zelltypen eines Menschen ausbilden, aber im Unterschied zur totipotenten Zelle kann kein eigenständiger Organismus mehr aus ihnen entstehen (Mountford et al., 1998). Die so genannten adulten Stammzellen findet man in den verschiedenen Geweben des erwachsenen Menschen. Man bezeichnet sie als multipotent, weil sie auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Entwicklung in spezialisierte Zelltypen eines Gewebes besitzen (Czyz et al., 2003; Lange et al., 2005; Storch et al., 2001)

1.4 2 Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen

Auch im Knochenmark des Menschen kommen multipotenten Stammzellen vor, unter anderem die *Bone Marrow stromal cells*, die auch als mesenchymale Stammzellen (hMSCs) bezeichnet werden. Sie stammen beim Menschen ursprünglich aus dem Mesoderm. Ihre Zahl im Knochenmark ist nur gering und nimmt mit zunehmendem Alter annähernd exponentiell ab. Findet man beim Neugeborenen noch etwa 10^2 MSCs pro 10^6 kernhaltige Zellen, so sind es beim Fünfzigjährigen nur noch etwa 2 pro 10^6 (Caplan, 1994). Wegen ihres großen Vermehrungs- und Differenzierungspotenzials wird jedoch immer häufiger empfohlen, diese Zellen in der regenerativen Medizin zu nutzen, um die Problematik der Dedifferenzierung adulter Chondrozyten im Rahmen der *in vitro* - Vermehrung zu umgehen. Basierend auf den grundlegenden Studien zum Differenzierungspotenzial von Knochenmark (Ashton et al., 1980; Friedenstein et al., 1968) wurde die Theorie der Existenz mesenchymaler Stammzellen postuliert (Caplan, 1991; Owen 1985;) und deren chondrogenes Potenzial untersucht (Barry et al., 2001b; Johnstone et al., 1998). Daneben wurde auch gezeigt, dass MSCs sich in Fettgewebe (Sekiya et al., 2004); Bennett et al. 1991), Knochengewebe (Jaiswal et al., 1997) und Muskelgewebe (Bennett and Adams, 1987; Ferrari et al., 1998) ausdifferenzieren lassen. Nach neueren Ergebnissen ist sogar anzunehmen, dass mesenchymale Stammzellen nicht nur für den Bewegungsapparat zuständig sind, sondern auch in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Perizyten (Fukuda and Fujita, 2005; Gojo and Umezawa, 2003) sowie in solchen mit neuronalem Charakter differenzieren können (Kopen et al., 1999; Zhao et al., 2002)

1.4.3 Die Heterogenität der im humanen Knochenmark vorkommenden MSCs

Auch nach Abtrennung von Erythrozyten und hämatopoetischen Stammzellen erhält man aus einem Knochenmarkaspirat noch keine homogene Zellpopulation. Man muss vielmehr mit den Stammzellen unterschiedlicher Herkunft und Funktion rechnen (Colter et al., 2001). Das in der Abbildung 5 dargestellte schematische Modell soll diese Heterogenität verdeutlichen. Aus den undifferenzierten hMSCs, so genannten RS (*self renew*) Zellen (Abbildung 5 im roten Rahmen) gehen durch asymmetrische Teilung unterschiedliche Tochterzellen hervor. Dabei entstehen entweder wieder identische Stammzellen oder nicht identische Progenitorzellen der differenzierten Zielzellen. Die Progenitorzellen haben nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial. Sie teilen sich symmetrisch und bringen tri- und bipotente Zellen hervor, die den multipotenten hMSCs zwar morphologisch ähnlich sind, aber bereits ein abweichendes Genexpressionprofil aufweisen (Baksh et al., 2004). In einem gegebenen Knochenmarkaspirat wird man daher neben den eigentlichen Stammzellen auch die verschiedenen Zwischenstufen auf den

sich verzweigenden Wegen zu den Zielzellen vorfinden (Abbildung 5 im gelben Rahmen) (Baksh et al., 2004; Gronthos et al., 2003). Dabei hängt der Anteil der jeweiligen Progenitorzellen vom individuellen Zustand des Spenderorganismus zum Zeitpunkt der Entnahme des Aspirats ab (Phinney et al., 1999). So wurde berichtet, dass im Durchschnitt nur etwa ein Drittel der humanen MSCs ein tripotentes (chondro-, osteo- und adipogenes) Entwicklungspotenzial aufweist (Zuk et al., 2002)). Diese Heterogenität eröffnet einerseits die Möglichkeit für Tissue Engineering, macht aber andererseits auch deutlich welches Problem bei der Nutzung von hMSCs aus dem Knochenmark zu lösen ist. Denn für die Herstellung eines hyalinen Knorpelgewebes muss eine möglichst homogene Population differenzierter Chondrozyten zur Verfügung stehen.

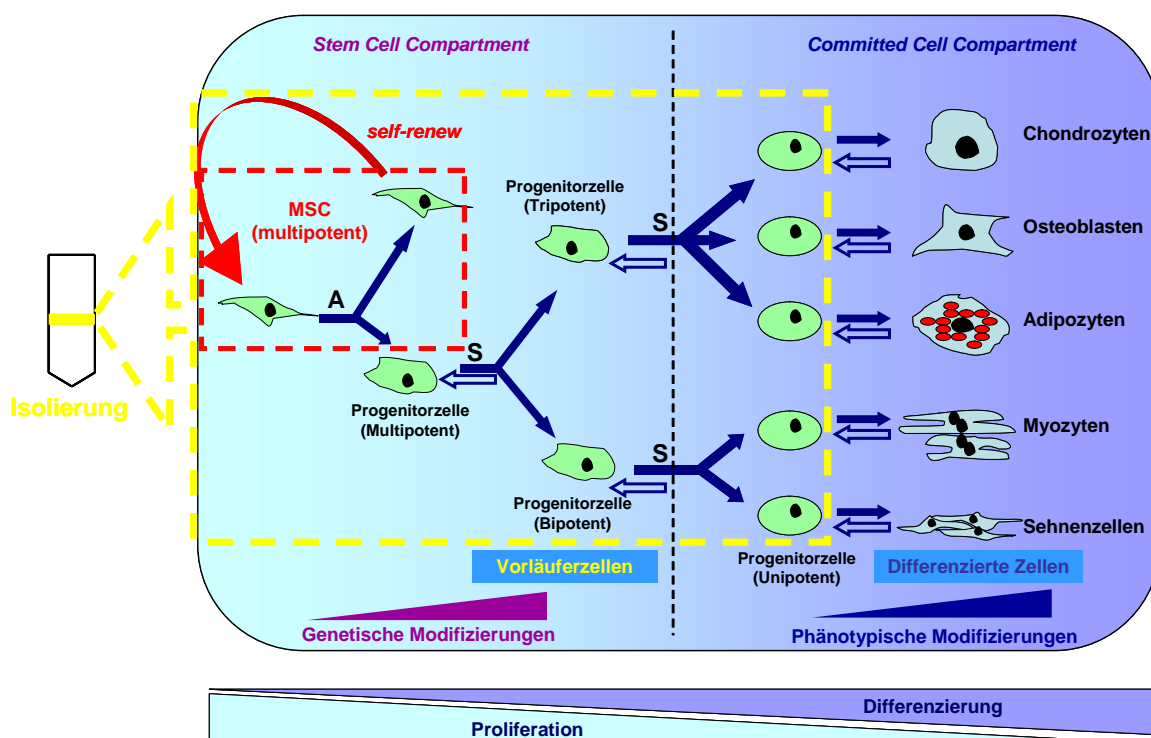


Abbildung 5: Ein Modell der Entwicklung der adulten MSC

Die multipotenten, undifferenzierten MSC teilen sich asymmetrisch. Dadurch entstehen eine identische Stammzelle (im roten Rahmen) und eine nicht identische Progenitorzelle. Danach durchlaufen die MSC genetische Modifikationen und generieren Progenitorzellen mit vergleichbarem Phänotyp und Selbsterneuerungspotential. A - Asymmetrische Zellteilung, S - symmetrische Zellteilung. Die verschiedenen Differenzierungszustände werden nicht nur nacheinander durchlaufen, sondern existieren in einem Knochenmark-Aspirat auch stets gleichzeitig nebeneinander (im gelben Rahmen). Die Darstellung ist modifiziert nach Bakch (Bakch et al., 2004).

1.4.4 Methoden zur Gewinnung einer für die *in vitro* Chondrogenese geeigneten Zellpopulation aus dem Knochenmark

Die in einem Knochenmarkspirat angetroffene Heterogenität der Zellpopulationen macht eine wirkungsvolle Selektion der für die chondrogene Differenzierung geeigneten Zellen notwendig. Erfolgreiche Versuche, direkt Chondrozyten aus dem Gemisch verschiedener Zelltypen zu isolieren, sind bisher nicht beschrieben, wahrscheinlich, weil der Anteil von Zellen mit differenziertem Phänotyp zu niedrig ist. Auch der Ansatz, alle Zellen zu erfassen, die sich bereits auf dem Wege der chondrogenen Differenzierung befinden (blaue Kreise in der Abbildung 5), greift zu kurz. Einerseits müssten für dieses Verfahren spezifische Marker für jedes Differenzierungsstadium zur Verfügung stehen, was zurzeit noch nicht der Fall ist (Bianco and Gheron Robey, 2000; Conget and Minguell, 1999; Yoo et al., 2005), andererseits lassen sich vollständig und partiell differenzierte Zellen *in vitro* wesentlich schwieriger unter Erhalt des Differenzierungsstatus vermehren als undifferenzierte. Dies beruht auf dem Phänomen, dass das Proliferationspotenzial mit zunehmendem Differenzierungsgrad abnimmt, was mit dem blauen und roten Keil unter der Abbildung 5 angedeutet werden soll.

Vor allem das letzte Argument spricht für die Alternative, möglichst präferentiell die undifferenzierten Stammzellen zu vermehren. In diesem Fall kann die Chance genutzt werden, dass der relative Anteil der sich seltener teilenden, partiell differenzierten Zellen mit der Anzahl der Passagen abnimmt. Diese Idee erwies sich bisher besonders dann als erfolgreich, wenn die Zellen zur Proliferation gleichzeitig in sehr starker Verdünnung ausgesät wurden (Prockop et al., 2001). Es ist anzunehmen, dass die Differenzierung fördernde parakrine Faktoren bei einer höheren Anfangs-Zelldichte schneller akkumulieren, was dann zur Drosselung der Proliferationsrate führt. Die Folge wäre nicht nur eine geringere Endzellzahl, sondern auch eine Erhöhung der Heterogenität der Zellpopulation hinsichtlich des Differenzierungsstatus der einzelnen Zellen und nicht eine Erniedrigung.

Die Vermehrungskapazität einer Population mesenchymaler Stammzellen in einer Zellkultur hängt sowohl vom Alter und Zustand des Knochenmarkspenders als auch vom Entnahmezeitpunkt ab (Caplan, 1994; Digirolamo et al., 1999). Daher wurde ergänzend auch versucht, die mitogene Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren wie FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) und EGF (Epidermal Growth Factor) zu nutzen, um die Proliferationsrate maximal zu steigern (Bianchi et al., 2003; Gruber et al., 2004; Yao et al., 2003). Allerdings wird damit das Ziel der selektiven Anreicherung der undifferenzierten Zellen streng genommen verlassen, da proliferationsstimulierende Wachstumsfaktoren häufig auch das Differenzierungspotenzial beeinflussen. Ob dieser sich als Vorselektierung äußernde Effekt im Sinne des angestrebten Ziels unerwünscht oder erwünscht ist, muss im Einzelfall überprüft werden.

Neben der maximalen Proliferationsrate wurden auch andere Kriterien zur Anreicherung von Zellen mit bestimmtem Differenzierungspotenzial vorgeschlagen. So scheint die Anwendung eines mechanischen Zell-Siebes zur Selektierung von Zellen mit bestimmter Größe ebenso einfach wie erfolgreich zu sein (Hung et al., 2002). In einem anderen Fall wurde versucht, durch Sedimentation der Zellen über einen Ficollgradienten unerwünschte Progenitorzellen abzutrennen (Lange et al., 2005).

1.4.5 Methoden zur Identifizierung verschiedener Populationen von hMSCs

Die Möglichkeit zur reproduzierbaren Anreicherung oder Isolierung bestimmter mesenchymaler Zelltypen einschließlich der Progenitorzellen macht eine leistungsfähige Methode zur Zell-Identifizierung erforderlich. Trotz intensiver Suche ist es in den letzten Jahren jedoch noch nicht gelungen, eindeutige hochspezifische Oberflächenantigene für diese Fragestellung zu finden. Aus diesem Grund ist es auch bisher nicht möglich gewesen, Zellsorter zur Isolierung definierter mesenchymaler Zelltypen einzusetzen. Zurzeit können lediglich die auf hämatopoetischen Stammzellen und Leukozyten vorkommenden Antigene CD34 bzw. CD45 zum Nachweis der Abwesenheit dieser Zelltypen genutzt werden. Lediglich in Kombination werden einige positive Marker bei routinemäßigen Kontrollen eingesetzt. Dazu gehören unter anderem CD105 (Endoglin), ein Rezeptor für den Wachstumsfaktor TGF- β 1, CD90 (Thy1), ein Thymocyten-Antigen sowie die Antigene STRO1 und CD106 (VCAM1) (Barry et al., 1999; Gronthos et al., 2003; Simmons and Torok-Storb, 1991; Tepliashin et al., 2005). Spezifische Antikörper, die gegen diese Antigene gerichtet sind, können zwar im Rahmen von FACS-Analysen wichtige Hinweise geben, ersetzen aber nicht die aufwändigere Identifizierung der Zellpopulationen über ihre Fähigkeit, sich zu den verschiedenen Zielzellen differenzieren zu lassen (Pittenger et al., 1999).

1.4.6 Die Pellet-Kultur als Differenzierungsmodell

Ein entscheidender Fortschritt für eine mögliche Nutzung der *in vitro* Chondrogenese waren Studien, die demonstrierten, dass sich die vermutete Proliferationskapazität auch praktisch nutzen lässt (Yoo et al., 1998). Nach den Untersuchungen über die Möglichkeit, MSCs *in vitro* zu Osteoblasten (Jaiswal et al., 1997) und Chondrozyten (Mackay et al., 1998) zu differenzieren, fand das zugrunde liegende Differenzierungsmodell der Pellet-Kultur eine schnelle Akzeptanz (Johnstone et al., 1998; Yoo et al., 1998). Dabei wurde auf verschiedenen Wegen demonstriert, wie wirkungsvoll die Anlage von 3D-Kulturen für die Erzeugung von Knorpelreparaturgewebe für artikuläre Knorpeldefekte ist (Adkisson et al., 2001; Angele et al., 1999; Solchaga et al., 1999). In den meisten Fällen werden Zell-Zell-Kontakte zur Auslösung eines 2-3 Wochen dauernden Differenzierungsprozesses

genutzt, der in der Regel zusätzlich durch verschiedene Differenzierungsfaktoren unterstützt wird. So konnte Barry zeigen, dass die verschiedenen TGF- β -Isoformen - β 1, - β 3 eine starke chondrogene Wirkung aufweisen (Barry et al., 2001b). Die beiden Faktoren binden an Endoglin (CD 105), welches bei der Kontrolle der chondrogenen Differenzierung von MSCs und deren Wechselwirkung mit hämatopoetischen Stammzellen von Bedeutung ist (Barry et al., 2001a). Es ist bekannt, dass die Faktoren TGF- β 1 bis - β 3 auch im embryonalen Knorpel gebildet werden, wo ihnen eine wichtige Rolle bei der chondrogenen Transformation im Rahmen der Zellkondensationen zugeschrieben wird (Hall and Miyake, 2000). Ein weiterer wichtiger Faktor mit stark anabolen Eigenschaften ist IGF-I, der bereits mit Erfolg zur Knorpelbildung in Tiermodellen eingesetzt wurde (Hardingham et al., 1992; Yaeger et al., 1997). Die häufige Verwendung von Dexamethason zur Unterstützung der Differenzierung beruht auf der Beobachtung, dass es die Bildung des Transkriptionsfaktors Sox9 stimuliert (Sekiya et al., 2002).

1.4.7 Grenzen der Pellet-Kultur als Differenzierungsmodell

Trotzt der Erfolgen bei der Verwendung der verschiedenen Formen der Pellet-Kultur werden jedoch auch die Grenzen dieses Differenzierungsmodells für den Einsatz im Rahmen des *Tissue Engineering* sichtbar. Die immer wieder zusammen mit der Expression von Kollagen Typ II gezeigte Zunahme der Bildung von Kollagen Typ I und Typ X führt zur Vermutung, dass mit der Technik der Pellet-Kultur alle chondrogenen Differenzierungsstadien der mesenchymalen Zelle bis zur terminalen Differenzierung durchlaufen werden (Parsch et al., 2004). Voraussetzung für die Nutzung *in vitro* differenzierter Zellen für die Bildung von hyalinem Knorpel muss jedoch die permanente Arretierung im Differenzierungsstatus der Chondrozyten sein, für den zwar die Expression von Kollagen Typ II, nicht aber die des Typs X charakteristisch ist.

1.5 Ein alternatives Differenzierungsmodell für mesenchymale Stammzellen

Die Entwicklung eines alternativen Differenzierungsmodells, das die Nutzung mesenchymaler Stammzellen für die *in vitro* Herstellung von hyalinem Knorpel zum Ziel hat, muss die Ursachen berücksichtigen, die möglicherweise für das Scheitern des Pelletkultur-Modells in der bisherigen Form verantwortlich sind (Lorenz et al., 2005; Parsch et al., 2004). Hier bieten sich verschiedene Ansatzpunkte an.

1. Die beim Pelletkultur-Modell beobachtete unerwünschte terminale Differenzierung könnte Folge einer sehr erfolgreichen *in vitro* Simulierung der Chondrogenese in der

Wachstumsfuge sein, die auch die Hypertrophierung der Chondrozyten miteinschließt. In diesem Fall müsste geprüft werden, in wie weit dieser Prozess *in vitro* etwa durch Einsatz geeigneter Wachstumsfaktoren kontrolliert, bzw. unterbrochen werden kann.

2. Alternativ kann auch angenommen werden, dass die Pellet-Kultur ein unzureichendes Modell für die Chondrogenese darstellt. Während bei der Chondrogenese *in vivo* eine Reihe von Prozessen in topologisch und zeitlich geordneter Weise ablaufen, die in den einzelnen Phasen durch unterschiedliche Faktoren unterstützt werden, wird in der Pellet-Kultur eine über mehrere Wochen konstant gehaltene Kulturbedingung appliziert. Es ist zu vermuten, dass die Bedingungen, die die Differenzierung der noch sehr unreifen mesenchymalen Stammzellen anfangs fördern, später eine hemmende Wirkung auf schon differenzierte Zellen haben, die bereits mit der Matrixbildung begonnen haben. Hier könnte möglicherweise eine über die Kulturdauer geänderte Zusammensetzung der zugesetzten Wachstumsfaktoren Abhilfe schaffen. So ist bekannt, dass die am häufigsten zur Förderung der Differenzierung eingesetzten Faktoren, TGF- β 3 und Dexamethason, die Matrixbildung hemmen (De Luca, 2006; Fujita et al., 2004; Goessler et al., 2006; Ohno et al., 2005). Hier könnte konkret bereits das Weglassen dieser Faktoren einen positiven Einfluss haben. Allerdings sind entsprechende Protokolle bisher nicht bekannt.
3. Vorstellbar ist weiterhin, dass beim Einsatz einer hinsichtlich des Differenzierungsstatus der Zellen heterogenen Zellpopulation von Anfang an asynchrone Bedingungen in der Pellet-Kultur vorliegen. Während ein Teil der Zellen von der Präsenz der angebotenen Differenzierungsfaktoren profitiert, wird der andere Teil an der Matrixbildung gehemmt. In diesem Fall müsste zusätzlich zur zeitlichen Anpassung des Wachstumsfaktor-Profiles auch die Matrixbildung so lange aufgehalten werden, bis alle Zellen denselben Differenzierungsstatus aufweisen.

1.5.1 Das Drei-Phasen-Modell

Die im letzten Abschnitt unter Punkt 3 geforderten Bedingungen könnten in einem so genannten Drei-Phasen-Modell überprüft werden. Es könnten den drei im Rahmen der Chondrogenese ablaufenden Prozessen - Proliferation, Differenzierung und Matrixbildung voneinander getrennte Zeiträume zugeordnet werden, so dass die Kulturbedingungen für jede Phase separat optimiert werden können. Wie mit dem Schema in Abbildung 6 verdeutlicht, stellt die Pellet-Kultur als Differenzierungsmodell im Vergleich dazu lediglich ein Zwei-Phasen-Modell dar. Die Idee, unterschiedliche Stadien der Entwicklung voneinander zu trennen, ist dabei nicht prinzipiell neu. Dass die Trennung der Gewebebildung von der Proliferation Vorteile bringt, wurde schon früher erkannt (Strehl et al., 2002). Im aktuellen Fall ändert sich für die erste und dritte Phase wenig: Die Proliferation kann

konventionell in Monolayer - Technik und die Matrixbildung in Pellet-Kultur durchgeführt werden. Für die zweite Phase bietet die Einbettung in Alginat-Gel gute Voraussetzungen.

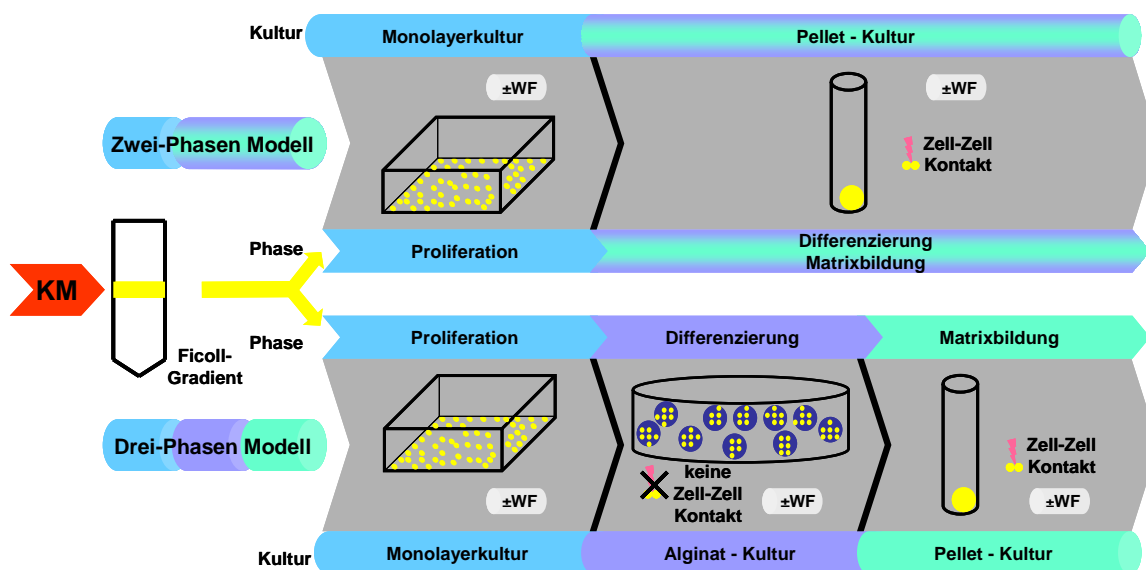


Abbildung 6: Zwei- Phasen und Drei- Phasen Modell zur chondrogenen Differenzierung der hMSC

In einem Zwei-Phasen-Modell (direkte Pellet-Kultur) werden die Zellen nach der Isolierung aus dem Knochenmark-Aspirat selektiv vermehrt in der Proliferationsphase (erste Phase), zu einer Pellet-Kultur sedimentiert (zweite Phase) und für drei Wochen kultiviert. Dabei laufen zwei unterschiedliche Prozesse (Differenzierung und Matrixbildung) und stören sich gegenseitig. Die zusätzliche Phase in der Alginat-Kultur trennt zeitlich die Differenzierung der Zellen und die Matrixbildung (Drei-Phasen-Modell).

1.5.2 Die Alginatkultur-Technik

Alginat besteht aus linearen Polymeren, die aus Braunalgen gewonnen werden. Ähnlich wie Agarose bildet es ein großporiges Gel, jedoch nicht beim Abkühlen aus verdünnter Lösung, sondern in Gegenwart von Ca^{++} -Ionen (M&M 2.4). Dies bedeutet einen ganz wesentlichen Vorteil. Denn durch eine kurze Behandlung mit EDTA als Chelator für die Ca^{++} -Ionen lässt sich das Alginat-Gel wieder depolymerisieren. In Alginat eingebettete Zellen können so wieder freigesetzt werden. Insbesondere die Verträglichkeit mit Chondrozyten wurde schon ausgiebig demonstriert (Hauselmann et al., 1992). Auch wurde die Einbettung von Chondrozyten in Alginat bereits zur Redifferenzierung von Chondrozyten beschrieben (Chubinskaya et al., 2001; Heyland et al., 2006; Mok et al., 1994). Einige Autoren haben die Synthese Knorpel - spezifischer Marker, wie Kollagen der Typen II, IX und X in Alginat beschrieben (Bonaventure et al., 1994; Petit et al., 1996). In verschiedenen Tiermodelle ist es auch gelungen, aus im Alginat-Gel differenzierten und wieder isolierten Chondrozyten Knorpel *in vitro* zu züchten (Heyland et al., 2006). Am Beispiel der Einbettung in ein Agarose-Gel wurde bereits die Möglichkeit

der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Anwesenheit von TGF- β 3 und Dexamethason gezeigt (Huang et al., 2004; Shyy and Chien, 1997). Andere Autoren haben Alginat zu diesem Zweck eingesetzt und die Expression von Kollagen Typ II sowie die Bildung von Glykosaminoglykanen nachgewiesen (Kavalkovich et al., 2002; Mehlhorn et al., 2006).

Die besondere Eignung der Alginatkultur-Technik für das Drei-Phasen-Modell liegt darin, dass die zur Matrixbildung essentiellen Zell-Zell-Kontakte während der Differenzierungsphase wirkungsvoll verhindert werden. Der schematische Vergleich des Zwei – Phasen – Modells mit dem Drei – Phasen – Modell ist in der Abbildung 6 dargestellt.

Wichtig ist weiterhin, dass sich die während der mehrwöchigen Kultivierung differenzierten Zellen wieder zurückgewinnen lassen, um sie analysieren oder mit Hilfe der Technik der Pellet-Kultur zur Matrixbildung einsetzen zu können. Dies ist ein für den geplanten Einsatz zum *Tissue Engineering* sehr bedeutsamer Aspekt.

1.6 Das Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit wurde mit der Absicht begonnen, das große Vermehrungs- und Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen zu nutzen, um die Voraussetzungen für die *in vitro* Herstellung von Knorpel-Implantaten für die Therapie von Gelenkflächendefekten zu verbessern. Nach dem Stand der Wissenschaft haben die zahlreichen Untersuchungen am Differenzierungsmodell der Pellet-Kultur zwar sehr wichtige Erkenntnisse für die Verfolgung dieses Ziels geliefert, gleichzeitig aber auch dessen Grenzen aufgezeigt. Mit der Alginatkultur wird darauf aufbauend ein alternatives Differenzierungsmodell entworfen, das, integriert in ein Drei-Phasen-Modell, die *in vitro* Herstellung von hyalinem Knorpel aus Zellen des Knochenmarks ermöglichen könnte. Zur experimentellen Überprüfung dieser These stellten sich konkret die folgenden vier Aufgaben:

1. Erarbeitung von Bedingungen zur Anreicherung oder Isolierung mesenchymaler Zellen aus humanem Knochenmark, die sich zur chondrogenen Differenzierung eignen
2. Quantitative Differenzierung humaner mesenchymaler Zellen zu Chondrozyten mit differenziertem Phänotyp in der Alginatkultur
3. Analyse der differenzierten Zellen
4. Funktionelle Überprüfung der differenzierten Zellen durch ihre Fähigkeit zur Bildung von humanem Knorpelgewebe

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die bei der Durchführung der Experimente eingesetzten Materialien und Methoden beschrieben. Die Gliederung dieses Abschnittes erfolgt dabei in der Reihenfolge der durchgeführten Versuche. Zuerst werden die Zellkulturmethoden und die Isolierung des zu untersuchenden Probenmaterials beschrieben. Im Anschluss erfolgt die Darstellung der verschiedenen Analysemethoden sowie Angaben zur statistischen Auswertung. Alle in diesem Teil beschriebenen Methoden sind die Standardmethoden. Mögliche Abweichungen sind im Ergebnisteil vermerkt.

Chemikalien und Lösungen:

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad "zur Analyse" verwendet und von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Deutschland) Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma (München, Deutschland). Die Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (Milli-Q, Water Purification System, Bedford, USA) hergestellt und bei Bedarf autoklaviert (20 Min., 120 °C, 2x10⁵ Pa) oder steril filtriert (Porendurchmesser 0,25 µm, Sartorius Minisaart).

2.1 Zellkultur

Material:

- sterile Werkbank Hera Safe (Heraeus, Hanau)
- CO₂/ O₂-Inkubator (Heraeus Instruments GmbH, Hanua)
- CASY® Cell Counter + Analyser System Model TT (Schärfe System, Reutlingen)
- CASY-Puffer (Schärfe System, Reutlingen)
- Zentrifuge Hettich Rotanta/TRC (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Mikroskop (Olympus CK2, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Wasserbad GFL (Labortechnik GmbH Burgwedel)
- Pipetten 5er Set (Eppendorf, Hamburg)
- Waage Mettler PC180 (Mettler-Toledo GmbH Giessen)
- Akku- Pipette für Zellkultur Accu-Jet (Brand GmbH, Wertheim)
- PBS, (Gibco 14190-994, Invitrogen)

- Trypsin-EDTA Lösung (Gibco 25300-054, Invitrogen)
- DMEM +1000 mg/L Glucose +GlutaMax I (GIBCO 21885-025, Invitrogen)
- DMEM +4500 mg/L Glucose +GlutaMax I (GIBCO 31966-021, Invitrogen)
- Penicillin-Streptomycin 10.000 units/mL (GIBCO 15140-122, Invitrogen)
- Antibiotic/Antimycotic Solution (100x) (GIBCO 15240-062, Invitrogen)
- Fötale Kälberserum (FKS) (Cat N: DE14-801F 8 South American Origin, USA)
- Wachstumsfaktoren: bFGF, TGF- β 3, IGF-I, PDGF-BB (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA), Dexamethason (Sigma, München)

Alle Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur stammen von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Sarstedt (USA) und Falcon (Becton Dickinson Labware, USA)

2.1.1 Gewinnung und Isolierung der Stammzellen und Chondrozyten

Humane Stammzellen

Material:

- Kulturmedium: DMEM 1000 mg/L Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
- Ficoll 1,077 g/ml (Sigma, München)

Durchführung:

Die Versuche zu dieser Arbeit wurden mit humanen Stammzellen durchgeführt, die von der Knochenmarktransplantationsabteilung des Universitätsklinikums Eppendorf zur Verfügung gestellt wurden. Das durch Aspiration aus dem Beckenknochen gewonnene Knochenmark (2 bis 3 ml) wurde zuerst in 20 ml DMEM LG, supplementiert mit 10 % FKS resuspendiert. In einem nächsten Schritt sollten die kernhaltigen Zellen von den anderen Zelltypen abgetrennt werden. Dies geschah mithilfe eines Ficoll – Gradienten. Hierfür wurden 20 ml Ficoll in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 20 ml Probe vorsichtig überschichtet. Dies erfolgte ganz langsam um die sich bildende Grenze zwischen, Ficoll - Phase und Zellsuspension - Phase, gut erkennen zu können. Abschließend wurden die Röhrchen 20 Minuten bei 800*g (ohne Bremsen) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde eine ringförmige ca. 0,5 bis 1 cm dicke Phase in der Mitte der Röhrchen sichtbar (Abb.7).

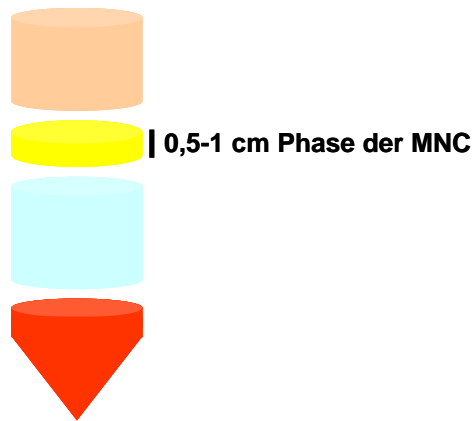


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ficoll-Gradienten-Auftrennung

Die Phase (gelbe Markierung) der mononukleären Zellen (MNC) nach Auftrennung in Ficoll-Gradienten.

Diese Phase wurde ganz vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Als nächstes wurden zu 2 bis 3 ml entnommener Zellsuspension 10 ml serumhaltiges Medium gegeben. Die Röhren mit der Zellsuspension wurden zentrifugiert (5 min bei 400*g) und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml frischem Medium aufgenommen und die erhaltenen Zellen mithilfe des CASY-Gerätes gezählt. Anschließend wurden die Zellen in einer Größenordnung von 6 bis 20 Mio. Zellen pro T 25 oder T 75 Kulturflasche für 72 Stunden ausplattiert

Humane Chondrozyten

Material:

- Formalin 4% in PBS, pH 7,4 (Merck, Darmstadt)
- Petrischale
- Skalpelle
- RNAlater Stabilisation Lösung (Qiagen GmbH, Hilden)

Durchführung:

Die Quelle für den humanen Knorpel war die Abteilung für Gerichtsmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf. Die aus der Gerichtsmedizin erhaltenen Knorpelstücke wurde gewaschen, von Blut- und Geweberesten befreit und in einer Petrischale mit Skalpellen zerkleinert. Für die Histologie wurden die Knorpelstücke in Formalin und für die PCR Analyse in RNAlater Stabilisation Lösung aufbewahrt.

2.1.2 Zellpräparationen

Es wurde insgesamt 34 Isolierungen von hMSC aus Knochenmarksaspirat aus dem Becken durchgeführt. Das Alter der gesunden Spender variierte von 2 bis 42 Jahren (20 Männer und 14 Frauen). Nach der Isolierung sollten die humanen Stammzellen erstmal

vermehrt werden, um eine ausreichende Menge für die angestrebten Versuche zur Verfügung zu stellen. Je nach Anzahl der isolierten Zellen und Verwendung wurden diese nach Ficoll-Gradient-Trennung entweder in ein, zwei oder drei Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen die unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert wurden, wurden als unterschiedlichen Zellpräparationen betrachtet.

2.1.3 Zellzählung

Material:

- CASY-Zellzähler (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland)
- CASY-Puffer (Schärfe System, Reutlingen)
- Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim)
- Trypanblau-Lösung: 0,5 g Trypanblau (Sigma, München), 0,9 g NaCl, auf 100 ml a. dest. Wasser

Durchführung:

Der Anzahl sowie die Vitalität der Zellen wurde in der Regel mithilfe des CASY-Zellzählers, ermittelt. Die Messwerte konnten für weitere Auswertungen ausgedruckt werden. Falls nötig erfolgte zusätzlich eine Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung. Trypanblau ist ein Farbstoff, der von der Membran lebender Zellen zurückgehalten wird, wobei die toten Zellen mit poröser Zellmembran für den Farbstoff durchlässig sind und blau angefärbt werden. Die Zellsuspension und Trypanblau-Lösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und die Zellen zügig ausgezählt. Die Vitalität ergab sich aus dem Verhältnis der Lebendzellzahl (ungefärbte Zellen) zur Gesamtzellzahl (ungefärbte und blau gefärbte Zellen).

2.2 Proliferation der Zellen

Material:

- Kulturmedium: DMEM 1000 mg/L Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin

Durchführung:

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach folgendem Schema. Abb.8

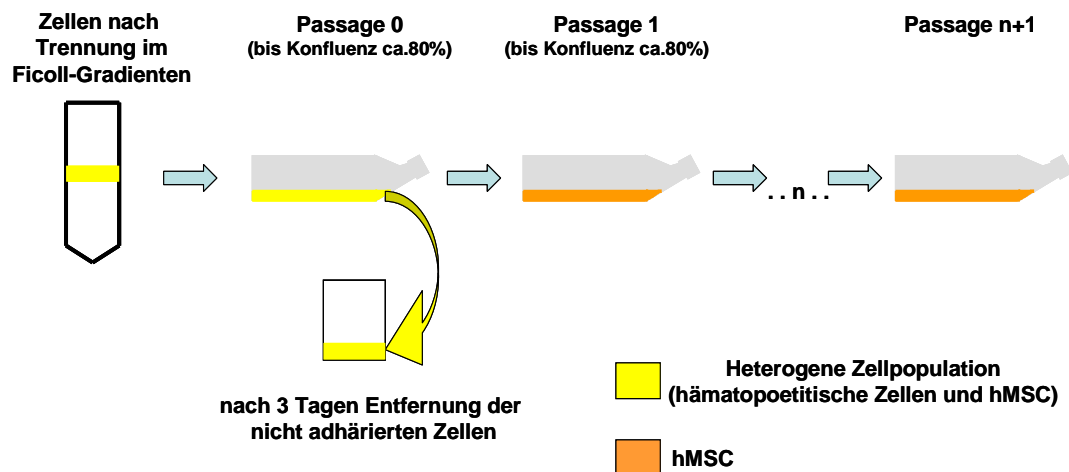


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Zellkultur der hMSC

Die Zellen wurden in Kulturflaschen ausgesät und in DMEM supplementiert mit 10% FKS, 1% Penicillin / Streptomycin bis zu 80 %-iger Konfluenz proliferiert. Dabei wurde das Medium zwei bis drei Mal pro Woche gewechselt. Vor der Trypsinierung der Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen. Je nach Inhalt der Kulturflasche wurde ein entsprechendes Volumen von Trypsin/EDTA Lösung zugegeben (T25-Flasche: 2,5 ml, T-75-Flasche: 4,5 ml, T-175-Flasche: 7 ml) und die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei Bedarf wurden die restlichen Zellen durch Abklopfen abgelöst und danach das Trypsin durch Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert. Die Anzahl der Zellen wurde bestimmt und die Zellen bei 400 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen wieder in serumhaltigem Medium aufgenommen und je nach Verwendung in entsprechender Aussaatdichte ausplattiert. In der Regel wurden die Zellen nach Passage 1 für die Alginatkultur, die Pelletkultur oder Analysen verwendet. Je nach der Verwendung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Faktoren supplementiert. Die dazu verwendeten Faktoren sowie deren Konzentration sind unten aufgelistet.

Wachstumsfaktor	Konzentration [ng/mL]
bFGF	10 ng/mL
TGF	10 ng/mL
PDGF	1 ng/mL

2.2.1 Wachstumsverhalten

Für die Wachstumskinetik wurden hMSC in einer gegebenen Konzentration

in Kulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² (T75) ausgesetzt und unter bestimmten Bedingungen kultiviert. Alle 14 Tage wurden die Zellen trypsiniert, ausgezählt und unter den jeweiligen Zellkulturbedingungen weitergeführt. Der Vermehrungsfaktor wurde wie folgt berechnet:

$$VF = \text{Zellzahl nach Passage } n / \text{Zellzahl nach Passage } n-1$$

VF-Vermehrungsfaktor

n – Passagenummer

Für P0 nach Adhärenz wurde keine VF ermittelt, da die Ausgangszahl der hMSC nach der Ficoll-Gradient-Auftrennung nicht bekannt war. Die Erstellung der Wachstumskurve einer Zellpopulation (Proliferationsrate) erfolgte durch Hochrechnung der Zellanzahl einer Flasche. Als Ausgangspunkt für die Wachstumskurve diente die Anzahl der Zellen nach Passage 0.

2.3 Differenzierung der Zellen *in vitro*

Material:

- Kulturmedium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
- ITS+ (BD Biosciences, Heidelberg)
- Natriumpyruvat (Sigma, München)
- Ascorbinsäure-2-phosphat (Sigma, München)
- Prolin (Sigma, München)
- Dexamethason (Sigma, München)
- TGF-β3 (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)
- IGF-I (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA)
- ITS+ (BD Biosciences, Heidelberg)

2.3.1 Chondrogenese Zwei-Phasen Modell

Direkte Chondrogenese

Durchführung:

Für die direkte Chondrogenese wurden die Zellen zunächst, wie oben beschrieben, trypsiniert, mit PBS gewaschen und gezählt. Danach wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und entsprechend der Verwendung in ein differiertes Volumen vom Medium aufgenommen. Das Medium wurde mit folgenden Substanzen supplementiert:

Substanz	Endkonzentration
Dexamethason	0,39 µg/ml

Natriumpyruvat	100 µg/ml
Ascorbinsäure-2-phosphat	50 µg/ml
Prolin	40 µg/ml
IST+	1:100 (v/v)

Danach wurde die Zellsuspension in mehrere 15 ml Röhrchen aufgeteilt, so dass man pro Röhrchen 300.000 Zellen erhielt. Die Erstellung der Pellets erfolgte durch Zentrifugation (5 min bei 200*g). Anschließend wurden die Pellets in Polypropylen – Röhrchen mit halbgeöffneten Deckel zum besseren Gasaustausch im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 20% O₂ inkubiert. Nach 2 Tagen wurden die Pellets, die zu diesem Zeitpunkt zu Kügelchen geformt waren, in eine 12-well-Platte (ein Pellet pro well mit 2 ml Medium) überführt. Der Mediumwechsel erfolgte 3-mal pro Woche bis zur Beendigung des Versuches nach 21 Tagen.

2.3.2 Chondrogenese Drei-Phasen Modell

Herstellung von „Alginate-Beads“

Material:

- Alginate 2,4% Alginate in 1-fach Waschpuffer 150 mM NaCl (Sigma, Steinheim)
- 1-fach Waschpuffer (150 mM NaCl pH 7,4)
- Calcium-Puffer (100 mM CaCl₂)

Durchführung:

Die Differenzierung der Stammzellen erfolgte in der Alginate-Kultur. Zum diesen Zweck wurden die Zellen in Alginategel eingebettet. Dafür wurden die Zellen nach dem Trypsinieren und der Zellzählung abzentrifugiert (5 Minuten, 400 g) und dann in 1-fach Waschpuffer gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 Minuten, 400 g) wurden die Zellen in Waschpuffer aufgenommen und mit 2,4% Alginate im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Endkonzentration des Alginats betrug somit 1,2%. Soweit es nicht anderes angegeben ist, erfolgte die Differenzierung der Zellen in Alginate bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml. Für die Herstellung der Alginatekultur (Alginate-„Beads“) wurde die Zellsuspension in eine Petrischale mit Calcium-Puffer getropft. Beim Eintropfen in den Calcium-Puffer polymerisiert Alginate, so dass sich Alginatekügelchen (*Beads*) bilden (Abb.2).

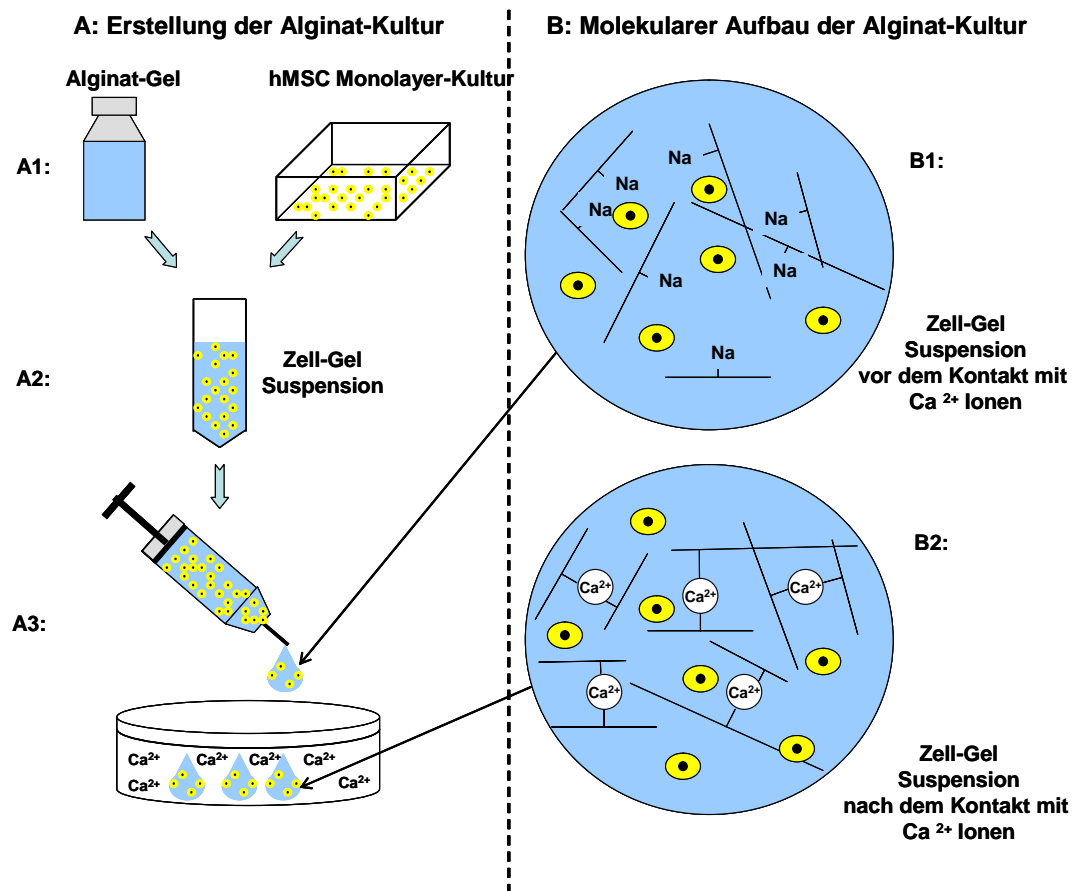


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Alginat-Kultur der hMSC

Die Alginat-Kultur wird in drei Schritten erstellt (A): Im ersten Schritt (A1) werden die hMSC von dem Boden der Zellkulturflasche enzymatisch abgelöst und die Alginatgel-Lösung wird vorbereitet. Im zweiten Schritt (A2) werden beiden Komponenten in einem definierten Verhältnis zusammengegeben und vermischt. Im dritten Schritt (A3.) wird diese Zell-Gel-Suspension mithilfe einer Pipette tropfenweise in eine CaCl_2 Lösung gegeben und verweilt dort bis zur Polymerisation. Der molekulare Aufbau der Alginat-Kultur mit hMSC (B) vor der Polymerisation (B1) und danach (B2).

Für die Aushärtung dieser so genannten Alginat „Beads“ reichten etwa 10 Minuten im Calcium-Puffer aus. Aus einem Milliliter Zellsuspension ergaben sich ca. 40 bis 45 Alginats-Beads, die jeweils ca. 40.000 bis 50.000 Zellen enthielten.

Nach 10-minütiger Aushärtung für 10 Minuten wurden die *Beads* einmal mit 1-fachem Waschpuffer und danach zusätzlich noch einmal mit supplementiertem Medium gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in Medium mit Zusätzen aufgenommen und für die weitere Kultivierung in sterile Kolben überführt.

Alginate-Kultur

Durchführung:

Die Zellen in Alginate -„Beads“ wurden in Kulturmedium (s. oben) für ein bis 3 Wochen bei 37 °C, 5% CO₂ und 10% O₂ kultiviert. Dem Kulturmedium (fünffaches Volumen) wurden, soweit nicht anders angegeben, folgenden Faktoren zugegeben:

Substanz	Endkonzentration
Dexamethason	0,39 µg/ml
Natriumpyruvat	100 µg/ml
Ascorbinsäure-2-phosphat	50 µg/ml
Prolin	40 µg/ml
IST+	1:100 (v/v)

Während der Kultivierung im Alginate bildete sich rund um die eingebetteten Zellen eine perizelluläre Matrix die hofartig geformt war. Dieser Hof wird in Analogie zu den Chondronen als Pseudochondron bezeichnet.

Isolierung der Zellen aus Alginate und Weiterverarbeitung

Material:

- EDTA-Puffer (40mM EDTA in 150 mM NaCl pH 7,4)
- 1-fach Waschpuffer (150 mM NaCl pH 7,4)

Durchführung:

Die Isolierung der Pseudochondrone aus dem Alginate erfolgte in mehreren Schritten. Nach dem Waschen in 1-fachem Waschpuffer, wurden die Zellen in einem EDTA-Puffer von mindestens fünffachem Volumen der *Beads* für ca 5 -10 min unten Schütteln inkubiert. Nach dem vollständigen Auflösen des Alginategels wurden die Pseudochondrone 5 min bei 200*g abzentrifugiert, in Waschpuffer resuspendiert und abschließend gezählt. Für die Analyse benötigte Pseudochondrone wurden bei diesem Schritt entnommen. Die restlichen Pseudochondrone wurden wieder abzentrifugiert und je nach Versuch in unterschiedlich supplementiertem Medium aufgenommen und für die weitere Verarbeitung in Pellet-Kultur verwendet (s. Pellet – Kultur nach Alginate).

Pellet-Kultur nach Alginate

Durchführung:

Die Erstellung der Pellets nach Alginatekultur erfolgte nach dem gleichen Prinzip, wie für die direkte Chondrogenese beschriebener Methode, jedoch mit einer Abweichung. Die Quantifizierung der Zellen für die Pellet-Kultur nach Alginate erfolgte durch Zählen der

Alginate – „Beads“ (ca. 50 000 Zellen pro Bead). Abschließend erfolgte die Zentrifugation der Pseudochondrone bei 200*g für 10 min. Standardmäßig wurden den Pellets nach Alginate die gleichen Faktoren wie bei der direkten Pellet – Kultur zugegeben. Abweichungen bei den zugegebenen Faktoren sind bei der Beschreibung der jeweiligen Versuche angegeben.

2.3.3 Adipogene Differenzierung

Material:

- Erhaltungsmedium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
- Adipogenese induzierendes Medium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1µM Dexamethason, 0,2mM Indomethacin, 0,5mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin, 2 µM Insulin.

Durchführung:

Zur Durchführung der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/cm² in 6 Wellplatten ausgesät und mit dem jeweiligen Kulturmedium 5-7 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Danach wurde die Kultur (Tag 0) drei Tage lang mit einem die Adipogenese induzierenden Medium stimuliert (Pittenger et al., 1999). Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen für zwei Tage in die Adipogenese-Erhaltungsmedium weiterkultiviert. Dieser Medienwechsel-Zyklus von drei Tagen mit Induktionsmedium und zwei Tagen mit Erhaltungsmedium wurde dreimal wiederholt und die Kulturen anschließend für eine Woche im Erhaltungsmedium weiterkultiviert. Auch nicht stimulierten Kontrollen wurden gleich behandelt, nur dass anstelle des Adipogenese induzierenden Mediums das erhaltende Medium eingesetzt wurde. Der Nachweis der Adipogenese erfolgte histologisch (s. Oil Red O Färbung).

2.3.4 Osteogene Differenzierung

Material:

- Basismedium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin
- Osteogenese induzierendes Medium: DMEM 4500 mg/L Glukose, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,1µM Dexamethason, 10 mM β-Glyzerophosphat, 0,05 mM Ascorbinsäure–2–Phosphat.

Durchführung:

Die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen, erfolgte nach dem Differenzierungsprotokoll von Jaiswal (Jaiswal et al. 1997). Zur osteogenen Differenzierung wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen/cm² in 6 Wellplatte ausgesät, und bei 37 °C und 5% CO₂ 5-7 Tage mit Basismedium kultiviert und dann osteogen induziert (Tag 0). Die Stimulierung erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen

im die Osteogenese induzierenden Medium. Nicht stimulierte Kontrollen wurden gleich behandelt, nur dass an Stelle des Induktionsmediums Basismedium verwendet wurde. Der Nachweis der Formierung mineralisierter Matrix erfolgte histologisch (s. von Kossa Färbung).

2.4 Molekularbiologische Analysen

Material:

- Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf Hamburg)
- Vortexer VF2 (Janke&Kunkell KA Labortechnik)
- PicoFuge (Heidelberg Stratagene)

2.4.1 RNA Isolierung

Material:

- RNeasy-Kit inkl. Qiashreder-Homogenisation Kit und DNA-Verdau Kit mit dem RNase-free DNase I (Qiagen GmbH, Hilden)
- Mörser und Pistole
- Zellen, Pellets, oder Knorpel-Stücken
- Flüssiger Stickstoff
- Ethanol 70%
- 2-mercaptoethanol (Sigma , München)

Durchführung:

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten mit RNA mit Handschuhen durchgeführt. Die Gesamt RNA-Isolation wurde unter standardisierten Bedingungen, mithilfe des RNeasy-Kits durchgeführt. Für die Gesamt RNA Isolierung wurden die Zellen nach dem Trypsinieren und dem Waschen mit PBS eingesetzt. Für Gewinnung der RNA aus der Pellet-Kultur und nativem Knorpel wurden die biologischen Proben zunächst im Mörser mithilfe des Pistels zerquetscht (für Knorpel mithilfe flüssigen Stickstoffes) und dann gemäß der Herstellerangaben mit dem Kit aufgearbeitet. Die RNA wurde als Gesamt RNA in RNase-freiem Wasser und sterilisierten 1,5 ml fassenden Gefäßen als Aliquots von ca. 15µl bei -80°C gelagert. Die Arbeiten mit RNA sowie Auftauen des Aliquots wurden auf Eis durchgeführt.

Konzentrationsbestimmung von RNA

Durchführung:

Die RNA-Konzentration einer Lösung wurde im Photometer (Eppendorf GmbH, Hamburg) mithilfe der optischen Dichte bestimmt. Die Messung bei 260 nm gibt dabei den RNA-Gehalt an, bei 280 nm wird der Proteingehalt der Probe angezeigt. Der Quotient zwischen

260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der Probe. Dieser lag bei allen Versuchen im Normbereich zwischen 1,7 und 2,0. Die Proben wurden für die Messung mit H₂O im Verhältnis 1:50 (v/v) verdünnt. Die RNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{Extinktion} \times \text{Verdünnung} \times 0,04$$

2.4.2 cDNA Synthese

Material:

- cDNA Synthese Kit: Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Niederlande)
- Thermomixer (Eppendorf Hamburg)

Durchführung:

Zur cDNA Synthese wurde RNA-Lösung verwendet, die zuvor mit dem RNeasy-Kits isoliert worden war (s. RNA-Isolierung). Vor der cDNA – Synthese wurde die RNA-Konzentration wie oben beschrieben gemessen, so dass man für die zu vergleichende Proben immer gleiche Menge von RNA einsetzen konnte. Für die Synthese von cDNA-Molekülen, die komplementär zu den mRNA-Molekülen sind, wurde das cDNA Synthese Kit verwendet. Als Primer wurden Oligo(dT)-Primer verwendet. Die Zusammensetzung des kompletten Reaktionsansatzes (pro Probe) war:

- | | |
|--|-----------------------------|
| • Oligo (dT)-Primer | 1 μ l |
| • RNA in RNase freiem Wasser | 100 ng |
| • 10 mM dNTP - Mix | 1 μ l |
| • <u>mit DEPC. H₂O auf</u> | <u>13 μl</u> |
| • 5x First Strand Puffer | 4 μ l |
| • RNaseOUT (40 U/ <u>μl</u>) | 1 μ l |
| • 0,1 M DTT | 1 μ l |
| • Reverse Transkriptase (AMV) | 1 μ l |
| • <u>Gesamt</u> | <u>20 μl</u> |

Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 60°C (Annealing) und dann 60 Minuten bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 5 Minuten bei 85°C deaktiviert und das cDNA-Synthese Produkt bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Durchführung:

Die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde nach zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt:

1. Messung der optischen Dichte mittels Absorptionsspektrometrie mithilfe des Photometers (Eppendorf GmbH, Hamburg). Die DNA-Konzentration kann photometrisch über die Messung der optischen Dichte der DNA-Lösungen ermittelt werden. Für die Messung wurden die Wellenlängen von 260-280 nm verwendet. Die Proben wurden für die Messung mit H₂O im Verhältnis 1:50 (v/v) verdünnt.

2. Die Abschätzung der Konzentration mittels Agarosegelelektrophorese. Um die Konzentration von DNA-Proben zu bestimmen, die sich nicht photometrisch bestimmen ließen, wurde eine Referenz-DNA (DNA-Standard, Invitrogen) bekannter Konzentration und Größe auf das Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung kann die DNA - Konzentration der Probe im Vergleich zu der Referenz-DNA abgeschätzt werden.

2.4.3 DNA-Auftrennung im Agarosegel

Material:

- Agarose Pulver (Biorad, Laboratories GmbH, München)
- Elektrophoresekammer mit Zubehör (New England Biolab, Frankfurt aM)
- 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat; 1mM EDTA; pH 8,0 (Essigsäure))
- 6xDNA-Probenpuffer -Roti Load DNA (ROTH, Karlsruhe)
- Ethidiumbromid Lösung (10mg/ml)
- Geldokumentation BDA Digital, Kamera Canon Power Shot G3 und Software BioDoc Analyze (Biometra GmbH, Göttingen)
- Größenstandard 100bp DNA ladder (ROTH, Karlsruhe)

Durchführung:

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele verwendet. Dabei richtet sich die Konzentration der Agarosegele nach der Größe der Fragmente, die aufgetrennt werden sollten. Je nach Größe der Fragmente wurden 1.0% bis 2.0%-ige Agarose Gele in 1x TAE-Puffer verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde Agarose in 1x TAE- Puffer aufgekocht. Die Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid erfolgte nach dem Abkühlen der Gel-Lösung auf etwa 50 °C. Danach wurde das Gel in den Gelträger gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Je nach Dicke und Dichte des Gels wurden unterschiedliche Spannungen (von 50 bis 120 V) angelegt. Zu allen Proben wurde vor jedem Gellauf 6xDNA-Probenpuffer im Verhältnis 1:6 (v/v) gegeben. Die Visualisierung der DNA-Fragmente in den ethidiumbromidhaltigen Gelen erfolgte unter UV-Licht und wurde fotografisch dokumentiert. Die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten in Agarose-Gelen erfolgte durch den zugegebenen Größenstandard.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Material:

- Platinum® Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Niederlande)
- PCR-Maschine TGradient (Biometra, Göttingen)
- Primer:

Primer für PCR			
Gen	Sequenz	Produkt Größe (bp)	Tm °C
GAPDH	forward - ACCACAGTCCATGCCATCAC reverse - TTCACCACCCTGTTGCTGTA	455	55
Kollagen Typ I (Col1a1)	forward - TGACGAGACCAAGAAGT reverse - CCATCCAAACCACTGAAACC	660	55
Kollagen Typ II (Col2a1)	forward - GGCAATAGCAGGTTACGTACA reverse - CGATAACAGTCTTGCCCCACTT	614	62
Osteocalcin	forward - CATGAGAGCCCTCACA reverse - AGAGCGACACCCTAGAC	310	52
ALP	forward - ACGTGGCTAAGAATGTCATC reverse - CTGGTAGGCGATGTCCTTA	475	53

Tabelle 1: Primer für PCR

Durchführung:

Für einen PCR-Reaktionsansatz wurden pro Reaktion 100 ng Template-cDNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde in einem Volumen von 25µl wie folgt pipetiert.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
PCR-Puffer	2,5 µl	1X
10mM dNTP-Mix	0,5 µl	0,2 mM
50 mM MgCl ₂	0,75 µl	1,5 mM
Primer Mix	≥1 µl	je 0,5 µM
Template cDNA	≥1 µl	ca. 100 ng
Polymerase	0,2 µl	2 Units
H ₂ O	add 25 µl	

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Programm:

Schritt	Prozess	Tm (°C)	Zeit	
1	Denaturierung	95°C;	2 min.	-
2	Denaturierung	95°C;	30 sek.	Schritt 2 bis 4 34
3	Primerannealing:	Primerabhängig s. Primertabelle	30 sek.	Wiederholungen
4	Elongation	72°C;	30 sek.	
5	Elongation	72°C;	3 min.	
6	Aufbewahren	4 °C;	~	

Die Analyse der RT-PCR erfolgte in einem 1-2%igen Agarosegel (s. DNA-Auftrennung im Agarosegel).

2.4.5 Quantitative PCR (qPCR)

Material:

- LightCycler II (Roche GmbH, Mannheim)
- Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- LightCycler Capillaries (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Primer:

Primer für qPCR				
Gen	Sequenz	Produkt Größe (bp)	Tm °C	Referenz
GAPDH	forward - GAGTCAACGGATTTGGTCGT reverse - TTGATTTTGGAGGGATCTCG	238	57	NM_002046
Kollagen Typ I (Col1a1)	forward - AGGGCCAAGACGAAGACATC reverse - TGTTGTGCGATGACGTGATCT	137	57	NM_000088
Kollagen Typ II (Col2a1)	forward - CTCCTGGAGCATCTGGAGAC reverse - ACCACGATCACCTTGACTC	152	61	NM_001844
Kollagen Typ X	forward - CAGGCATAAAAGGCCCACTA reverse - AGGACTTCCGTAGCCTGGTT	179	57	NM_000493
Sox 9	forward - ACACACAGCTCACTCGACCTTG reverse - GGAATTCTGGTTGGTCCTCTCTT	102	61	NM_000346

Tabelle 2: Primer für qPCR

Durchführung:

Zur Quantifizierung von mRNA aus Zellen wurde wie folgt vorgegangen. RNA wurde wie in 2.4.1 beschrieben aus Zellen oder Zellaggregaten isoliert, wie in 2.4.2 beschrieben in cDNA umgeschrieben und mittels der Light Cycler Technik, nach Angaben des Herstellers, quantifiziert. Hierzu wurde für jede Probe der folgende Ansatz pipetiert:

- 10x Master SYBRGreen Mix 1,5 µl
- 25 mM MgCl₂ 1,8 µl
- Primer Mix 0,2 µl
- cDNA template ≥1 µl (ca. 100 ng)
- H₂O auf 15 µl

Die Primerpaarkonzentration im Reaktionsvolumen von 15µl betrug 400 nM (pro Primer). Zur Kontrolle wurde immer ein Reaktionsansatz ohne Template-cDNA pipetiert. Die Reaktion mit mindestens zwei Reaktionsansätzen pro Amplifikat wurden nach folgendem Programm durchgeführt.

Schritt	Prozess	Tm (°C)	Zeit	
1.	Denaturierung	95°C;	10min.	-
2.	Denaturierung	95°C;	1 sek.	Schritt 2 bis 4
3.	Primerannealing:	Primerabhängig s. Primertabelle	5 sek.	44 Wiederholungen
4.	Elongation	72°C;	20 sek.	
6.	Schmelzkurve	von 65 °C; bis 95°C;	-	
7.	Aufbewahren	4 °C;	~	

Die Detektion der Fluoreszenz von SYBR Green erfolgte während der Synthesephase bei 72 °C. Nach Ablauf des Programms wurde immer eine Schmelzanalyse der erhaltenen Produkte durchgeführt. Dadurch wurde die Produktspezifität überprüft. Analysiert wurden die Proben, die in der Schmelzkurvenanalyse nur einen deutlichen Peak, also ein Produkt, aufwiesen. Bei der Etablierung der Methode wurden nach jedem PCR-Lauf die erhaltenen PCR-Produkte sowohl auf Nebenprodukte als auch auf ihre Identität (Größe des Produktes) in einem Agarosegel kontrolliert.

Die Analyse der PCR-Daten erfolgte mithilfe der LightCycler Software Roche Ver.3. Die absolute Quantifizierung wurde mithilfe des Programms LinRegPCR Ver 7.5 2004 (Amsterdam Niederlande) durchgeführt. Das Programm erlaubt, anhand der aus der LightCycler-Software ins Excel-Format exportierten Daten die Anfangskonzentration an

Zielgenmolekülen in der eingesetzten cDNA-Lösung zu berechnen (Ramakers et al., 2003). Die relative Quantifizierung des Zielgens erfolgte mithilfe des *Housekeeping*-Gens GAPDH, dessen Expression in der Zelle als konstant vorausgesetzt wird (Barber et al., 2005). Von jeder cDNA wurde als Referenzwert die Konzentration von GAPDH bestimmt und die cDNA Konzentration darauf normiert (Kuhne and Oschmann, 2002). Die Expressionswerte wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2003 ausgewertet und graphisch dargestellt.

2.5 Proteinanalysen

2.5.1 Histologische Schnitte

Material:

- Gewebeeinbettautomat (Citadel, ThermoShandon)
- Mikrotom (Schlittenmikrotrom SM 200R, Leica)
- Objektträger Histo Bond (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG Lauda-Königshofen)
- Wärmeschrank WTB Binder ED 53
- Wasserbad GFL (Labortechnik GmbH Burgwedel)
- PBS, (Gibco 14190-994, Invitrogen)
- Ethanol Absolut (Merck KGaA Darmstadt)
- Formalin (4% in PBS, pH 7,4; Merck)
- Antikörper (s. Tabelle 3)

Primäre Antikörper				
Protein	Wirt/Isotyp	Hersteller	Verdünnung	Bemerkungen
CD 45	Mouse/IgG1	Acris	1:100	mono/FITC/F
CD 90	Mouse IgG1	Acris	1:100	mono/FITC/F
CD 105	Mouse IgG1	Acris	1:100	mono/FITC/F
CD 106	Mouse IgG1	Acris	1:100	mono/FITC/F
STRO-I	Mouse IgM	RD System	1:200	mono/F
Isotype Control	Mouse IgG	Acris	1:100	FITC/mono/F
Kollagen Typ I	Mouse IgG2	Acris	1:100	mono/C
Kollagen Typ I	Mouse IgG1	Medicorp	1:100	mono/PS
Kollagen Typ I	Goat/IgG	Southern Biotechnology Associates	1:1000	poly/WB
Kollagen Typ II	Mouse IgG2	Acris	1:100	mono/C
Kollagen Typ II	Mouse IgG1	Medicorp	1:100	mono/PS

Kollagen Typ II	Goat/IgG	Southern Biotechnology Associates	1:1000	poly/WB
Kollagen Typ VI	Mouse IgG2	Medicorp	1:100	mono/PS/C
Sekundäre Antikörper				
	Rabbit anti Goat IgG	Southern Biotechnology Associates	1:4000	WB
...	Goat anti Mouse IgG	Southern Biotechnology Associates	1:200	(H+L) Biotin
	Goat anti Mouse IgG	Chemicon	1:200	(H+L) Biotin
...	Goat anti Mouse /IgG	Invitrogen	1:500	PE/C
...	Goat anti Mouse / IgG	Chemicon	1:200	FITC/C
...	Goat anti Mouse /IgM	Acris	1:1000	FITC/F

Tabelle 3: Antikörper

Abkürzungen in der Tabelle: - C-Cytospins, PS-Paraffinschnitte, WB-Western Blot, F-durchflusszytometrische Analyse.

Durchführung:

Nach der Pellet-Kultur wurden die Pellets für mindestens 24 h in Formalin fixiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%-100%) entwässert. Für die Einbettung wurde ein Gewebereinbettungsautomat verwendet. Das in den Proben enthaltene Lösungsmittel wurde bei 56°C im Automaten durch Paraffin ersetzt. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden Gewebeschnitte von 5 µm Dicke angefertigt. Danach wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37° C getrocknet.

2.5.2 Immunfärbung**Material:**

- Hyaluronidase 0,5 mg ml⁻¹ in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 5,5 (Sigma, München)
- PBS, (Gibco 14190-994, Invitrogen, Karlsruhe)
- Deckgläser (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG Lauda-Königshofen)

- alkalische Phosphatase – Reagenz (Vectastain, Vector Laboratories, USA)
- Hämalaun-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt)
- Ultra Mount (Dako, Hamburg)
- Antikörper (s Tab.2)
- Substratlösung:
 - 150 ml Tris / NaCl-Puffer pH 8.24
 - 300 mg Natriumnitrit
 - 300 µl Neufuchsinlösung (5% in 2 M HCl)
 - 20-30 mg Naphthol-AS-BI-Phosphat in 750 µl Dimethylformamid

Durchführung:

Die histologischen Schnitte mussten für die Immunfärbung zunächst mit Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 70%, A. dest.) rehydratisiert werden. Anschließend wurden die Epitope mit Hyaluronidase bei 37°C in einer feuchten Kammer für 3 Stunden demaskiert. Dann wurden die Schnitte mit 10% FKS in PBS bei 37°C zum Blockieren der unspezifischen Bindungen für 30 min behandelt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern wurde in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C durchgeführt. Danach wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde für eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur vorgenommen. Beim nächsten Schritt wurde das alkalische Phosphatase–Reagenz auf die Schnitte aufgebracht und für 30 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit der Substratlösung für 30 min im Dunkeln. Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser gewaschen und in *A. dest.* überführt. Eine Gegenfärbung der Zellkerne mit 1:5 (v/v) mit *Aqua dest.* verdünnter Hämalaun-Lösung erfolgte für 30 sec. in einem Färbetrog. Abschließend wurden die Schnitte für 10 min. in Leitungswasser gebläut. Zum Eindeckeln der Schnitte wurden Ultra Mount und Deckgläser verwendet.

2.5.3 Semiquantitative Kollagen-Bestimmung (PAGE, Western Blot)

Material:

- Guanidinhydrochlorid 6 M in 0,2 M TRIS pH 8,5 (Sigma, Steinheim)
- Dithiothreitol (Serva, Heidelberg)
- 0,6 % und 10 %ige Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt)
- JAA-Lösung: 0,1 M Jodacetamid in DMSO (Sigma, Steinheim)
- Dialyselösung: 250 ml 6 M Harnstoff (Serva Heidelberg), 2,5 ml 0,1 M PMSF (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz) in DMSO, 1 ml JAA-Lösung
- Methylrot- Lösung: 2 % Methylrot in 0,6 % Essigsäure, (Merck KGaA, Darmstadt)
- 7,5% Trenngel für 10 Gele: 10 M Harnstoff (60 ml), A. dest. (17,5 ml), Eisessig (7 ml) , 14 ml 50 % Acrylamidlösung (Biorad, Laboratories GmbH, München), APS - 10 % Ammoniumperoxodisulfat 750 µl (Merck KGaA, Darmstadt), TEMED -

N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin 750 µl; (Biorad, Laboratories GmbH, München)

- 4% Sammelgel für 10 Gele: 31,6 ml Harnstoff, 13,4 ml a. dest., 300 µl Eisessig, 4 ml Acrylamid, 350 µl APS und 350 µl TEMED
- PBS (10-fach: 0,58 M Na₂HPO₄, 0,17 M NaH₂PO₄, 0,68 M NaCl)
- Waschpuffer: 0,2 % Casein (I-Block; Tropix, Bedford, USA)/ 0,1 % Tween 20 in PBS, 0,02 % Natriumazid (Merck KGaA, Darmstadt) in A. dest.
- Blocking-Puffer: 0,5 % Casein/0,1 % Tween 20 (Serva Heidelberg) in PBS und 0,02 % Natriumazid in A. dest.
- Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP), (Invitrogen Niederlande) 1:4000 in Waschpuffer
- Substratpuffer für AP: 0,1 M Diethanolamin (Tropix, Bedford, USA)/HCl, pH 10, 1 mM Magnesiumchlorid (Merck AG, Darmstadt), 0,02 % Natriumazid
- Substratlösung für AP: 66 µl p-Nitrotetrazolium-Blau (Sigma Steinheim, 50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid Merck KGaA, Darmstadt), 33 µl 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-Toluidinsalz (Sigma Steinheim, 50 mg/ml, in 100% Dimethylformamid) in 10 ml Substratpuffer.
- Blotmembran: PVDF-Membran (Biorad, Laboratories GmbH, München)

Durchführung:

Kollagen I und Kollagen II können isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt (PAGE) und mittels Westernblot nachgewiesen werden. Zum diesem Zweck wurden Pellets zunächst in 500 µl Guanidinhydrochlorid 2 Stunden lang bei 60°C inkubiert (sie lösen sich meist nicht auf!) . Nach der Zugabe von 50 µl Dithiothreitol wurde jede Probe weitere 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Zu den reduzierten Proben wurden 50 µl 10 % Essigsäure und 50 µl JAA-Lösung zugegeben. Dann wurde das Guanidinhydrochlorid durch 1-stündige Dialyse von 100 µl Probe entfernt. Als Dialyselösung wurden 250 ml 6 M Harnstoff, 2,5 ml PMSF und 1 ml JAA-Lösung in 0,6% Essigsäure angesetzt. Abschließend wurde dem gesamten Probenvolumen 10 µl Methylrot-Lösung zugegeben. Dann erfolgte die elektrophoretische Auftrennung, die in 7,5% Acrylamid-Gelen in Gegenwart von Essigsäure und Harnstoff durchgeführt wurde. Für die Herstellung der Trenngele wurden zur Gel-Lösung Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N'N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Polymerisation zugegeben. Danach wurde das Gel mit 500 µl 0,6 % Essigsäure überschichtet und konnte eine Stunde polymerisieren. Danach wurde das Sammelgel (4 %) gegossen und über Nacht zum Polymerisieren stehen gelassen. Die Reinigung der Gele erfolgte in der Elektrophoresekammer in 0,6 % Essigsäure bei 100 V für eine Stunde. Als Kollagen - Standard wurden Kollagen Typ I (100 ng, Rind) und Kollagen Typ II (50 ng, Rind) von Southern Biotechnology Associates in jeweils in die ersten beiden Taschen aufgetragen. Von jeder dialysierten Probe wurde in die weiteren Taschen jeweils 10 µl zugegeben. Dann wurde an die Gele eine Spannung von 100 V für 30 Minuten und 200 V für weitere 150 Minuten angelegt.

Das Blotting erfolgte in 0,6 % Essigsäure bei 80 V für eine Stunde. Danach wurde die Blotmembran zum Entwickeln zunächst 5 Minuten in PBS gewaschen und dann eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (s. Tab.1) wurde über Nacht durchgeführt. Dann wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend zwei Stunden mit dem sekundären Antikörper (s. Tab.) bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschen von 5 min in Waschpuffer wurden die Gele 30 Minuten mit Alkalischer Phosphatase bei RT behandelt. Dann folgten drei Waschschrte für 5 Minuten in Waschpuffer und zwei Waschschrte jeweils 5 Minuten in Substratpuffer für AP. Nach einer abschließenden Inkubation in Substratlösung für AP im Dunklen bei RT für 15 Minuten wurden die Blotmembranen zweimal fünf Minuten in A. dest gewaschen und getrocknet.

2.5.4 Erstellung der Cytospins

Material:

Zytokammer Zentrifugeaufsatz (von Hettich, schau bei Euch im Labor nach)

PBS, (Gibco 14190-994, Invitrogen)

Objektträger Histo Bond (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG Lauda-Königshofen)

Aceton (Merck KGaA, Darmstadt)

Durchführung:

Die aus der Alginatkultur gewonnenen Pseudochondrone wurden mit Hilfe der Zytokammer und Zentrifugeaufsatz auf speziell beschichtete Objektträger zentrifugiert (200*g 10 min). Dabei wurde die Zytokammer mit Dichtungsgummiring durch eine Klammer gegen Objektträger gedrückt und in einen Aufsatz angebracht. Durch die Zentrifugation entstand eine Kreisfläche mit Zellen von 0,85 cm². Pro Objektträger wurden ca. 10.000 Pseudochondrone aus der Alginat-Kultur in einem Volumen von 200 µl PBS verwendet. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit wurden die Objektträger aus der Zytokammer gelöst und getrocknet. Zum Aufbewahren können die Cytospins bei -80 C eingefroren und nach Bedarf später liegend aufgetaut werden. Die erhaltenen Cytospins wurden mit Aceton für eine Minute fixiert und eine Immunfärbung durchgeführt.

2.5.5 Fluoreszenzmarkierung von Pseudochondronen

Material:

Stammlösung von DAPI (5 µg/ml, Gebrauchslösung 0,1 µg/ml in Methanol)

Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)

Fluoromount-G (Biozol Vertrieb GmbH)

Deckgläser (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG Lauda-Königshofen)

Durchführung:

Die Fluoreszenzfärbung der Cytospins erfolgte wie oben für Paraffinschnitte beschrieben, jedoch mit einigen Unterschieden: Die Demaskierung mit Hyaluronidase dauerte nur 30 min. Ferner wurden die Cytospins mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (s. Tab. 1) im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und mit DAPI 15 min in Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Cytospins 3 x mit PBS gewaschen und mithilfe von Fluoromount-G mit Deckgläsern eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei 4° C im Dunkeln (max. 24 Stunden)

2.6 Sonstige Techniken

2.6.1 DNA-Bestimmung

Material:

- Fluorometer (Victor 1420 Multilabel counter, Wallac Distribution GmbH, Freiburg)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
- Papain-Lösung: 500 µl 0,1M NaH₂PO₄/0,005mM EDTA pH 6; 5 µl Mercaptoethanol; 2,5 µl Papain-Lösung (10 mg/ml; F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz)
- DNA-Verdünnungspuffer (2,5 M NaCl / 17,5 mM Natriumcitrat pH 7)
- Ansatzpuffer (2 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat pH 7)
- DNA Standard (25 µg/ml Kalbsthymus DNA, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz).
- Bisbenzimid-Lösung (Gebrauchslösung 2 µg/ml Bisbenzimid in DNA-Ansatzpuffer, Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg)

Durchführung:

Eine quantitative Aussage über der knorpelspezifischen Matrixbildung wird durch Anwendung der GAG- und DNA – Analyse ermöglicht. Der GAG/DNA –Wert gab Aufschluss darüber, wie viel Glykosaminoglykan und somit wie viel Matrix pro Zelle gebildet wurde

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurden die Proben über Nacht (16 Stunden) bei 60°C/800rpm in einem Thermomixer in mit 500µl Papain-Lösung gefüllten Eppendorfgefäßen verdaut. Zur Bestimmung wurden 50µl der erhaltenen Lösung mit DNA-Verdünnungspuffer 1:5 (v/v) verdünnt. Als Standard diente eine 1:5 verdünnte DNA Standardlösung. Für die DNA-Bestimmung wurde in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte 100 µl Ansatzpuffer vorgelegt. In die erste Zeile wurde in je zwei Wells 100 µl der verdünnten Probe gegeben und dann 1:2 (v/v) in den darunter liegenden wells immer weiter verdünnt. Dadurch entstand für jede Probe eine Verdünnungsreihe. Anschließend

wurden jeweils 100 µl Farbstofflösung zugegeben. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts wurde jede Probe doppelt in 96-well Mikrotiterplatten fluorometrisch gemessen. Die Messung der Platten erfolgte bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 460 nm in dem computerunterstützten Fluorometer. Die Messwerte wurden im Format von Excel-Dateien ausgegeben und mit Hilfe einer Regressionsanalyse (Excel-Macro; Adamietz) ausgewertet.

2.6.2 GAG-Bestimmung

Material:

- Photometer (Victor 1420 Multilabel counter, Wallac Distribution GmbH, Freiburg)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
- Papain-Lösung: 500 µl 0,1M NaH₂PO₄/0,005 mM EDTA pH 6; 5 µl Mercaptoethanol; 2,5 µl Papain-Lösung (10 mg/ml; F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Schweiz)
- Verdünnungspuffer (2 M NaCl / 15 mM Natriumcitrat pH 7)
- GAG-Standard: Chondroitinsulfat-C vom Hai 10 µg/ml (Sigma, Steinheim)
- 1,9-Dimethylmethylenblauchlorid-Lösung: 27,2 mg/l 1,9-Dimethylmethylenblauchlorid (Serva, Heidelberg), 5.168 g/l Glycin, 4.03 g/l NaCl, 32,3 ml/l 1 M HCl, Extinktion bei 525 nm 0,530

Durchführung:

Zur Bestimmung des GAG-Gehalts wurde die bereits für die DNA Analyse mit Papainpuffer hergestellte Matrixverdauung weiterverwendet. Zur Erstellung einer GAG-Standardkurve wurde vorab eine Stammlösung aus Chondroitinsulfat-C hergestellt. Die Messung wurde ebenso in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt wie die DNA-Bestimmung. In alle wells wurden 100 µl a. dest. vorgelegt, 100 µl der verdauten Probe zugegeben und wie oben beschrieben eine Verdünnungsreihe erstellt. Danach wurden in alle wells 150 µl 1,9-Dimethylmethylenblauchlorid-Lösung zugegeben und 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 530 nm. Die Auswertung erfolgte ebenfalls wie bei der DNA-Bestimmung mittels einer Regressionsanalyse.

2.6.3 Dimethylmethylenblau-Färbung (DMMB)

Material:

- Dimethylmethylenblau-Lösung: 78 mM 1,9 Dimethylmethylenblauchlorid (Merck Darmstadt) in a. dest.
- PBS, (Gibco 14190-994, Invitrogen)

Durchführung:

Zum qualitativen Nachweis von sulfatierten Glykosaminoglykanen, die eine entscheidende Komponente hyalinen Knorpels darstellen, wurden die aus dem Alginat isolierten Zellen

mit der Dimethylmethylenblau – Lösung versetzt. Nach 5 min. Inkubation wurden die Zellen mit PBS gründlich gewaschen und fotografisch dokumentiert.

2.6.4 Alcian – Blau Färbung

Material:

- 10% Formalin (10 ml der 37%-igen Lösung auf 27 ml PBS)
- Alcian-Blau-Lösung:
 - a) 50 mg Alcian-Blau-Lösung 8 GX (Sigma München) in 50 ml 0,9% NaCl plus 6 ml konz. Essigsäure, pH 1,5
 - b) 4g MgCl₂ (Fluka Nr. 63063) in 50 ml 0,9% NaCl
 a und b mischen nach 3 Tage durch einen 0,45 µm-Filter filtrieren
- 2 % Essigsäure (2 ml konz. Essigsäure mit 98 ml a.d. mischen)

Durchführung:

Mit der Alcianblau-Färbung erfolgt der histologische Nachweis von sauren Proteoglykanen. Dafür wurden die Alginatsbeads zuerst *in toto* für eine Stunde in 10 % Formalin bei RT fixiert. Danach für 5 min in 2 % Essigsäure waschen und über Nacht bei RT in Alcian-Blau-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Alginatsbeads zuerst 3 x in 2 % Essigsäure und dann 3x in A. dest. gewaschen. Danach erfolgte die mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation.

2.6.5 Oil Red O Färbung (Adipozytenfärbung)

Material:

Oil Red O Stammlösung

0,5g Oil Red O in 100ml Isopropanol p.A.

Oil Red O Färbelösung

Lösung Stammlösung /H₂O, (6v/4v)

24h stehen lassen und dann filtrieren

Durchführung:

Oil Red O ist ein Farbstoff, der im Lipidanteil von Geweben abgelagert wird. In der Vitalfärbung mit Oil Red O erscheinen neutrale Fette rot. Somit lassen sich eine zunehmende Anzahl wie auch die Vergrößerung der im Zytoplasma eingelagerten Fetttröpfchen über die Kulturdauer erkennen.

Der Zellrasen wurde nach dem Absaugen des Kulturmediums 30min. mit der Färbelösung überschichtet und bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS konnte man im Lichtmikroskop rot gefärbte Fetttröpfchen erkennen. Die Daten wurden fotografisch dokumentiert.

2.6.6 Von Kossa Färbung (Nachweis der osteogenen Mineralisierung)

Material:

- 5% Silbernitratlösung: 100 mg Silbernitrat in 2 ml Aqua Bidest lösen
- 1% Pyrogallol: 20 mg Pyrogallol in 2 ml Aqua Bidest lösen
- 5% Thiosulfat: 100 mg Natriumthiosulfat in 2 ml Aqua Bidest lösen
- Formalin (10% in PBS ohne Ca, pH 7,4; Merck)

Durchführung:

Mit der von Kossa Färbung wird die Bildung einer mineralisierten Matrix nachgewiesen. Das in Carbonaten und Phosphaten der Matrix gebundene ungelöste Kalzium wird durch Silberionen ausgetauscht und zu metallischem Silber reduziert. Kalziumhaltige Zonen färben sich braun-schwarz und lassen so deutlich den Grad der Mineralisierung erkennen. Bei der von Kossa Färbung wurden die Zellen 10 min in 10% Formalin fixiert. Nach Inkubation (30 min) in 5% Silbernitratlösung bei Tageslicht wurden die Zellen 2 x mit A. dest gewaschen. Dann wurden die Zellen 2-3 min mit 1% Pyrogallol abgedeckt und danach mehrmals mit A. dest. gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten mit einer Natriumthiosulfat-Lösung fixiert, 2 x mit A. dest. gewaschen und luftgetrocknet.

2.6.7 Durchflusscytometrische Analyse

Mit Hilfe der Durchflusscytometrie lassen sich sowohl die Zellgröße und die Granularität der Zellen als auch über fluoreszenzmarkierte Antikörper die verschiedenen Oberflächenmarker und intrazelluläre Moleküle untersuchen und nachweisen. Die durchflusscytometrischen Analysen dieser Arbeit wurden am Gerät Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern (s. Tabelle 3) gefärbt und mittels Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität analysiert. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (180°- Forward Scatter) gilt als Maß für die Größe der Zellen (kleine Zellen streuen weniger Licht). Das weitwinklig 90 Grad gestreute Licht, ein geringer Teil des Lichts, wird als Side Scatter Light (SC) erfasst und als Maß für die die Granularität der Zellen (Streuung wird durch Membranfaltung der Zellen beeinflusst) angesehen.

Material:

- Durchflusscytometer Cytomics FC 500 (Beckman Coulter)
- Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf Hamburg)
- Vortexer VF2 (Janke&Kunkell KA Labortechnik)
- Puffer (Beckman Coulter)
- Waschpuffer (PBS mit 1% FKS und 0,1% NaN₃)
- Fixierpuffer (PBS mit 1% Paraformaldehyd)
- Antikörper (s. Tabelle 3)

Durchführung:

Die zu analysierenden Zellen wurden zuerst mit Dulbecco's PBS pH 7,4 gewaschen, und für 10 Minuten in Ethanol fixiert. Nach der Zentrifugation bei 8000 rpm für 5 min wurden die Zellen in Waschpuffer mit FKS aufgenommen, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die Zellen in 1,5 ml Röhrchen entsprechend der Anzahl der Versuche aufgeteilt. Für die FACs Analyse wurden mindestens 100.000 Zellen pro Ansatz verwendet: Je $1 - 5 \times 10^5$ Zellen im 1,5 ml Gefäß abzentrifugieren (5 Min., 1.000 rpm, 4°C) 2 x mit 100 - 150 µl kaltem Waschpuffer waschen (5 Min., 1.000 rpm, 4°C). Zellen mit 5 - 10 µl der ausgetesteten Antikörperkonzentrationen (s. Tabelle 2) resuspendieren und 60 Min. im Dunkeln bei 4°C inkubieren. Danach wurden die Zellen 2 x mit Waschpuffer waschen. Bei direkt mit FITC markierten Antikörpern wurden die Zellen in 500 µl Fixierungspuffer aufgenommen. Bei nicht - konjugierten Antikörpern wurden die Zellen mit 5-10µl der ausgetesteten Antikörperkonzentrationen an sekundärem Antikörper resuspendiert, weitere 30 Min. im Dunkeln bei 4°C inkubiert und abschließend ebenfalls in Fixierungspuffer aufgenommen.

Die fluoreszenz-markierten Zellen wurden bis zur Messung auf Eis im Dunkeln aufbewahrt. Die Durchflusscytometrische Messung erfolgte am Cytomics FC 500 (Beckman Coulter). Die Auswertung des Prozentsatzes der markierten Zellen erfolgte mithilfe der Software (CXP Beckman Coulter) gegen unmarkierte Zellen (bei Analyse direkt nach dem Ficoll-Gradienten) bzw. gegen CD 45 (bei Analyse der Zellen nach Adhärenz). Auf Grund der möglichen Autofluoreszenz von Zellen wurden die Proben zur Kontrolle mit einem Kontrollantikörper inkubiert und analysiert (Isotypkontrolle bzw. Zweitantikörper bei der indirekten Markierung).

2.6.8 Quantitative Auswertung der gefärbten Cytospins

Die quantitative Auswertung der Anzahl der Chondronen war ein wichtiges Maß für die Differenzierungsstatus der Zellen. Zu diesem Zweck wurden die Pseudochondrone gegen knorpelspezifisches Kollagen II und Kollagen VI sowie gegen Kollagen I gefärbt. Nach der Aufnahme der Bilder von den Cytospins mithilfe des Fluoreszenzmikroskops wurden diese mithilfe des Programms Lucia G (Nikon GmbH, Düsseldorf) ausgewertet.

Diese Software arbeitete mit dem RGB-Verfahren (Rot Grün Blau) welches für jede Farbe ein Intensitätsspektrum von 0-255 definiert. Dabei konnte das Programm die gefärbte Bereiche (z.B. FITC oder DAPI) erkennen und sowohl deren Anzahl als auch deren Fläche auszählen. Die Fläche des ausgewählten Bereiches wurde gemessen und fungierte als eine Maske. Nach dem für das Programm geschriebenen Makro würde die Anzahl der grünen bzw. roten Bereichen (FITC und PE für die Matrix) mit der Anzahl der

blauen Bereichen (DAPI für die Zellzahl) in dieser Maske verglichen werden. Die blauen Punkte (Zellkerne) die einen grünen bzw. roten Bereich (Matrix) aufweisen, wurden als markierte Zellen betrachtet. Zusätzlich konnten die Flächen der gefärbten Bereiche ausgemessen werden. So konnte als Ergebnis nicht nur die Anzahl der gefärbten Zellen, sondern auch die relative Fläche der gefärbten Bereiche (grüne bzw. rote Farbbereichfläche durch Anzahl der blauen Punkte) ermittelt werden. In Anhang sind exemplarisch die *Screenshots* zur Demonstration des Verfahrens dargestellt.

2.7 Analytik

2.7.1 GAG/DNA-Analyse (G/D-Verhältnis)

Da die Zellzahl je nach Kulturbedingung bei den Versuchen variierte konnten die absoluten GAG-Werte nicht immer direkt miteinander verglichen werden. Aus diesem Grund wurde für die statistische Auswertung das GAG/DNA Verhältnis (G/D Verhältnis) gebildet. Zu diesem Zweck wurde der GAG/DNA - Quotient gebildet (GAG -Gehalt durch das DNA – Gehalt). Der erhaltene Wert gibt das Verhältnis von gebildeter Matrix zur Zellzahl an. Diese Analyse erlaubte sowohl den Vergleich als auch die statistische Auswertung der verschiedenen Versuche.

DNA-Eichkurve

Die Bestimmung der Zellzahl in Pellet-Kultur erfolgte indirekt über die Messung des DNA-Gehalts. Für die Auswertung wurde eine Regressionsanalyse von experimentell ermittelten DNA-Anfangswerten verwendet. Dafür wurde eine Eichkurve gebildet

Um die Genauigkeit der Zellzahlbestimmung zu überprüfen wurden die ermittelten Werte mit einem aus Literaturwerten entnommenem DNA-Gehalt (Baserga, 1989) verglichen. Für die Erstellung der Eichkurve wurden die Zellen der dritten Passage verwendet. Die Zellen wurden auf die jeweilige Zellzahl eingestellt (Tabelle 2), abzentrifugiert und sofort verdaut.

Zellzahl	12500	25000	500000	750000	100000	125000	15000	175000	2000000
	0	0			0	0	00	00	
Proben Anzahl	5	6	5	5	5	4	3	5	4

Tabelle 4: Die Zellzahl und Anzahl der genommenen Proben für die DNA-Eichkurve.

Die gemessenen Werte der Proben für die Eichkurve unterschieden sich nicht signifikant ($R^2 = 0,9987$, $p < 0,001$) von den erwarteten Werten (Abb. 10).

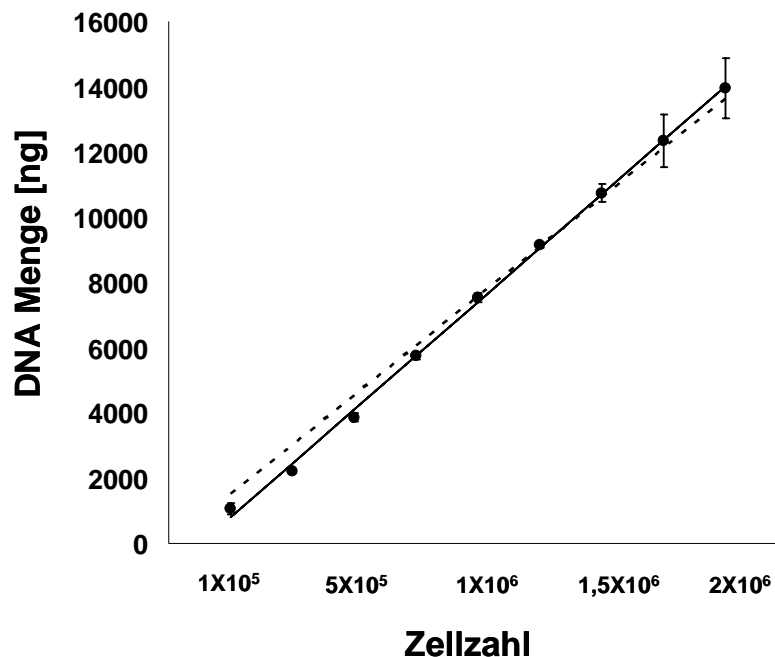


Abbildung 10: DNA-Eichkurve - Vergleich der Regression der erwarteten mit den gemessenen Werten

Die erwartete Regressionsgerade ist mit der gestrichelten Linie markiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt.

2.7.2 Statistische Auswertung und Bioinformatik

Für die Bestimmung von qualitativen Daten (z.B. Blots, oder Färbungen) wurde die Mindestanzahl von zwei Proben für die jeweiligen Versuchbedingungen analysiert. Für die statistische Auswertung der Versuche wurden mindestens drei Proben verwendet. Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mithilfe von Microsoft Excel 2003. Die jeweiligen Mittelwerte sind mit Standardabweichung bzw. der Regressionsgeraden angegeben. Die angegebenen Signifikanz-Analysen der jeweiligen Ergebnisse wurden mit dem t-Student Test ermittelt.

Für die Sequenzanalysen, das Primer - Design sowie die Datenbank-Recherche wurden folgende online Tools verwendet:

- National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- UCSC Genome Bioinformatics: <http://genome.ucsc.edu/>
- Whitehead Institute for Biomedical Research (Primer3): <http://frodo.wi.mit.edu/>
- Invitrogen OligoPerfect™ Designer: <http://www.invitrogen.com/>

3. Ergebnisse

Ziel der experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur chondrogenen Differenzierung der im Knochenmark des Menschen vorkommenden mesenchymalen Stammzellen. Der Ergebnisteil gliedert sich in die folgenden vier Teile:

- Gewinnung der Zellen
- Proliferation (*in vitro* Vermehrung)
- Differenzierung im Zwei – bzw. Drei – Phasen - Modell
- Matrixbildung

Da die zur Isolierung und *in vitro* Vermehrung der Zellen eingesetzten Methoden das Ergebnis der Differenzierung ganz wesentlich beeinflussen können, werden diese Schritte in gesonderten Kapiteln dargestellt. Es folgt eine Gegenüberstellung von Vor- und Nachteilen der beiden Differenzierungsmodelle. Im letzten Abschnitt wird die Fähigkeit der differenzierten Zellen zur Bildung von Knorpel nach Aggregation untersucht. Ergänzende Datensätze sind im Anhang zu finden.

Das folgende Schema (Abb.11) zeigt alle wesentlichen Schritte der Arbeit, deren Ergebnisse im Einzelnen weiter unten beschrieben werden.

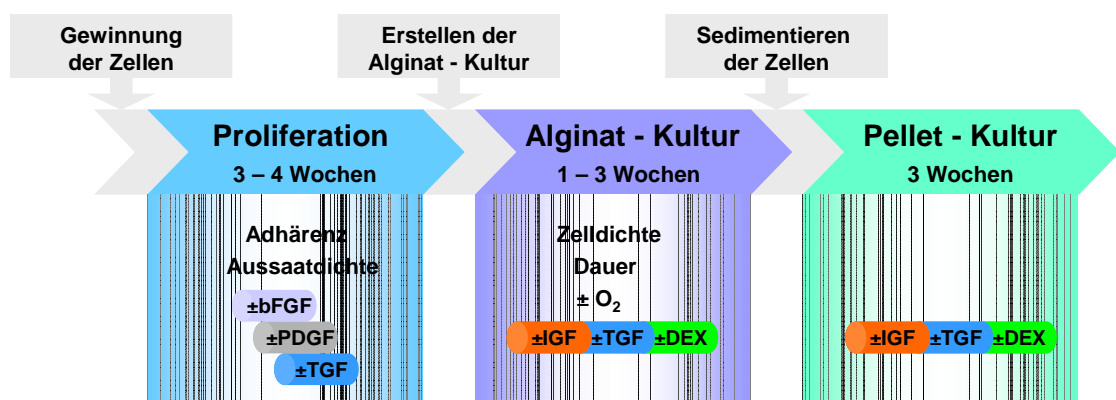


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ablaufs der Versuche

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Versuche unter Standardbedingungen durchgeführt, die im Kapitel „Material und Methoden“ aufgeführt sind. Abweichungen davon werden stets in der Legende zu den Abbildungen dargestellt.

3.1 Auftrennung der Zellen über den Ficoll-Gradienten

Zur Isolierung einer geeigneten Population humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSCs) wurden die durch Aspiration aus humanem Knochenmark gewonnenen Zellen zunächst einer Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten (s 2.1.1) unterworfen, um die mononukleären Zellen von Erythrozyten und Granulozyten abzutrennen. In der Abbildung 12 ist angedeutet, an welcher Position (gelbe Markierung) die kernhaltigen Zellen abgesaugt wurden.

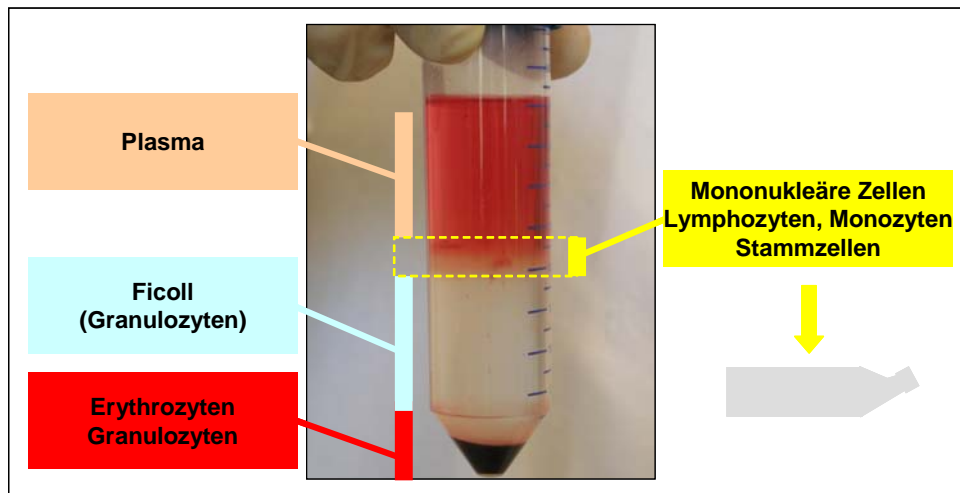


Abbildung 12: Die Auftrennung der Zellsuspension im Ficoll-Gradienten

Die Grenzphase (gelbe Markierung) zwischen Plasma- und Ficoll-Phase enthält die mononukleären Zellen (MNC).

Die Ausbeute der Zellen lag je nach Alter des Donors zwischen 6 Millionen bei älteren bis 20 Millionen Zellen bei jüngeren Spendern. Hauptbestandteil der so gewonnenen Zellen waren allerdings hämatopoetische Zellen. Der Anteil der undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen in der gesamten mononukleären Zellfraktion wird von verschiedenen Autoren auf etwa 1:100.000 geschätzt (Caplan *et al.* 1994).

3.1.1 Abtrennung der hämatopoetischen Zellen

Der große Überschuss an hämatopoetischen Zellen lässt sich mithilfe einer sehr einfachen und inzwischen weit verbreiteten Methode sehr wirkungsvoll reduzieren. Wie im Methodenkapitel beschrieben, adhären die Zellen des mesenchymalen Ursprungs hoch selektiv an Oberflächen üblicher Plastik-Zellkulturgefäße. Nach 24-72 h Adhäsion lässt sich der größte Teil der hämatopoetischen Zellen durch gründliches Auswaschen entfernen. Der Erfolg der Anwendung dieser Technik wurde routinemäßig mithilfe durchflusszytometrischer Analysen kontrolliert.

Dazu ist ein repräsentatives Ergebnis der selektiven Wirkung der Adhäsion der hMSC am Zellkulturflaschenboden in der Abbildung 13 dargestellt. Dafür wurden die

hämatopoetischen Zellen für die Durchflusszytometrie selektiv, mithilfe von gegen den spezifischen Oberflächenmarker CD 45 gerichteten Antikörpern fluoreszenzmarkiert. Die Analysen zeigen die Zelhäufigkeiten in Abhängigkeit von der Stärke des Fluoreszenzsignals.

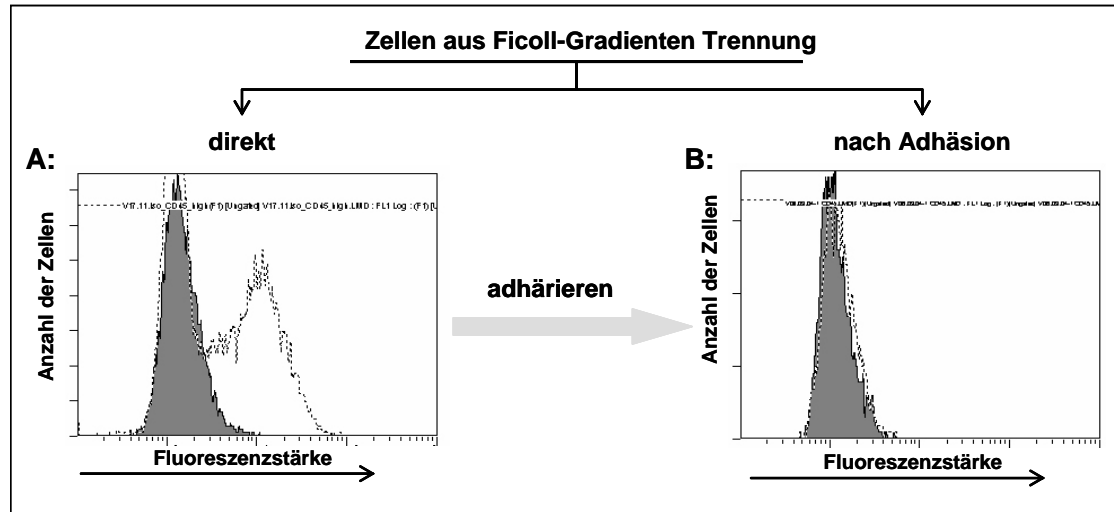


Abbildung 13: Erfolgreiche Entfernung CD45-positiver Zellen nach der Auftrennung im Ficoll – Gradienten und Adhäsion

Die Abbildung zeigt die Präsenz CD 45-positiver (gestrichelte Linie), hämatopoetischer Zellen vor und nach der Adhäsion. Als Kontrolle sind unmarkierte Zellen (graue Unterlegung) dargestellt.

A: Durchfluss-zytometrische Analyse CD 45-positiver (gestrichelte Linie), hämatopoetischer Zellen in einer frisch isolierten Zellpopulation.

B: Durchfluss-zytometrische Analyse CD 45-positiver Zellen (gestrichelte Linie) nach deren Entfernung durch Adhärenz (Passage 0).

Zum besseren Verständnis ist zusätzlich die Verteilung nicht CD 45 markierter Zellen durch graue Unterlegung gekennzeichnet. Beim Vergleich der beiden Grafiken fällt auf, dass hämatopoetische Zellen mit einer Fluoreszenz oberhalb des Rauschens nach der Adhäsionsphase praktisch nicht mehr nachweisbar sind.

In den Grafiken 14A und 14B wurden die Parameter Forward Scatter (FS) für die Größe und Side Scatter (SS) für die Granularität bzw. Rauigkeit der Oberfläche gegeneinander aufgetragen.

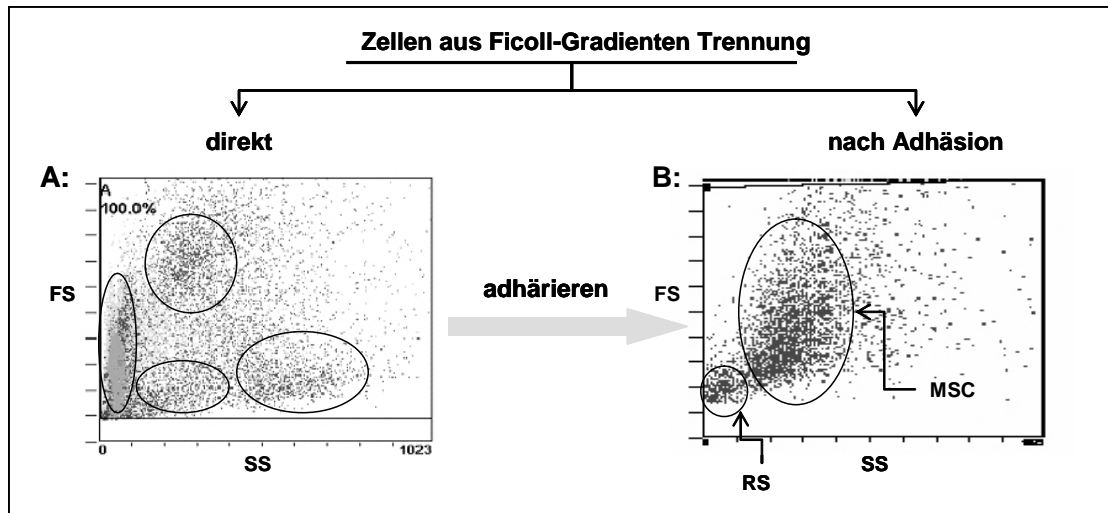


Abbildung 14: Unterschiedliche Morphologie der Zellen direkt nach der Ficoll-Gradienten-Auftrennung im Vergleich zu den Zellen, die an der Oberfläche der Kulturflaschen adhärerten

Die Zellen wurden nach Passage 0 trypsiniert (B) und mit den Zellen aus der Ficoll – Gradienten-Auftrennung (A) mithilfe von durchflusszytometrischer Analyse verglichen. Die Adhäsion der Zellen führt zur Reduktion der Heterogenität der Zellpopulation. Abkürzungen: FS Scale = Größe der Zellen. SS Scale = Granularität der Zellen. MSC = hMSC, RS –self renew Zellen (eine Subpopulation der hMSC).

Beim Vergleich der beiden Grafiken erkennt man bereits eine Reduktion der Heterogenität der eingesetzten Zellpopulation durch die Zelladhäsierung. Während vor der Adhäsion wenigstens 4 Fraktionen erkennbar sind, findet man nachher im wesentlichen noch zwei Populationen, eine kleinere mit kleinen, agranulären Zellen (RS) und eine größere mit großen, granulären Zellen (MSC), was gut mit den Daten anderer Autoren übereinstimmt (Prockop et al.,1997, Lange et al., 2005).

3.1.2 Die Heterogenität, der nach der Ficoll-Gradienten-Auftrennung gewonnenen Zellpopulation der hMSC

Der Einsatz der Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker verschiedener mesenchymaler Zelltypen bestätigt die erwartete Heterogenität der mononukleären Zellpopulation (MNC). Wie aus der prozentualen Aufteilung in Abbildung 15 entnommen werden kann, wird nur ein kleiner Teil der CD 45-negativen Zellen mit Antikörpern gegen vier verschiedene Oberflächenmarker erfasst.

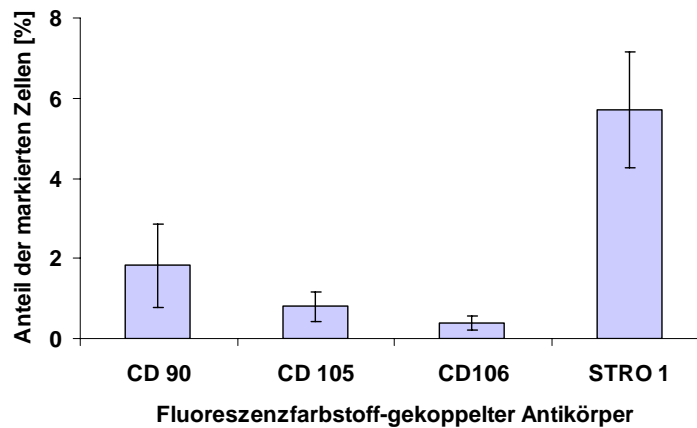


Abbildung 15: Analyse verschiedener Oberflächen-Antigene zur Charakterisierung der Heterogenität der MNC direkt nach der Auftrennung im Ficoll-Gradienten

Die Abbildung fasst die Ergebnisse der quantitativen Auswertung mittels Durchflusszytometrie zusammen. Vier verschiedene fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden zur Analyse der durch Ficoll-Gradienten-Zentrifugation gewonnenen Zellen eingesetzt. Neben CD 90- und CD 105-positiven undifferenzierten MSCs werden ganz wenig chondrogene, CD 106-positive Vorläuferzellen und deutlich mehr osteogene STRO I-positive Progenitorzellen gefunden (n=3).

Bereits von diesen Zellen ist der Anteil mit den Oberflächenmarkern mesenchymaler Zellen wie CD 90 (1,82%) und CD 105 (0,90%) niedrig. Auch Zellen mit dem Marker CD 106 (0,40%), der auf Chondrozyten und deren Progenitorzellen zu finden ist, sind kaum nachweisbar. Ein etwas höherer Anteil von Zellen trägt den Marker STRO-1 (5,73%), der auf die Gegenwart osteogener Vorläuferzellen hinweist. Insgesamt haben die Durchflusszytometrie-Analysen bestätigt, dass die aus dem Knochenmark isolierten Zellen nur einen sehr geringen Anteil von hMSC enthalten, die als Kandidaten für die chondrogene Differenzierung in Frage kommen. Auch nach der erfolgreichen Entfernung der hämatopoetischen Zellen mithilfe der Adhäsionstechnik bleibt die Zellpopulation noch sehr heterogen.

Ergänzt und bestätigt wurde dieser Eindruck durch die Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse mit der RT-PCR-Technik. Um festzustellen, wie groß der Anteil osteogen oder chondrogen differenzierter Zellen in der Fraktion der aus dem Knochenmark isolierten mononukleären Zellen ist, wurden Primer für solche Gene eingesetzt, deren erhöhte Expression für die entsprechend differenzierten Zellen charakteristisch ist. Zum Nachweis osteogen differenzierter Zellen wurde die mRNA von Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase und zum Nachweis von chondrogen differenzierten Zellen die mRNA von Kollagen Typ II sowie die mRNA von Kollagen Typ I als ein Marker für Stammzellen mit der Konzentration von GAPDH-mRNA verglichen. Die Abbildung 16 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der mittels PCR amplifizierten cDNAs der genannten Markergene auf einem Agarose-Gel. Man erkennt eine Expression der Marker für die osteogene Differenzierung, während es für das chondrogene differenzierungsspezifische Gen Kollagen II keine Evidenz gibt. Die Expression von

Kollagen Typ I, die für die Chondrogenese als unspezifisch gilt, wurde auch nachgewiesen.

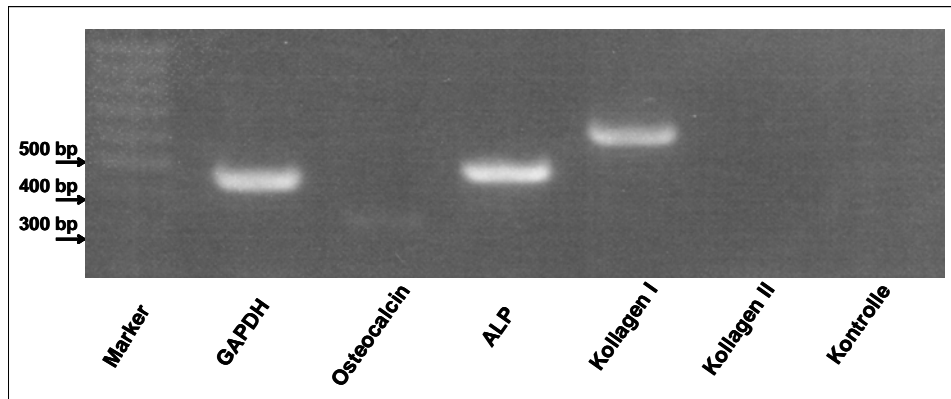


Abbildung 16: PCR-Analyse einiger Differenzierungsmarker direkt nach der Isolierung

Ein repräsentatives Ergebnis einer Gelelektrophorese zeigt mithilfe von PCR amplifizierte cDNAs der bezeichneten Gene. Eine basale Differenzierung ist nur für die osteogenen Marker Osteocalcin (schwache Bande), Alkalische Phosphatase (ALP) und Stammzellmarker Kollagen Typ I zu erkennen. Als positive Kontrolle dient das Housekeeping-Gen GAPDH, als negative Kontrolle ein PCR Ansatz ohne Template (Kontrolle).

3.1.3 Multipotenz der gewonnenen Zellen

Da ein direkter Nachweis von Chondrozyten oder deren Progenitorzellen in der aus dem Knochenmark isolierten Population mesenchymaler Zellen weder mithilfe der Durchflusszytometrie noch mithilfe der RT-PCR gelang, wurde versucht, das chondrogene Differenzierungspotenzial zu bestimmen. Dazu wurden die über die Ficoll-gradientenzentrifugation angereicherten und durch Adhäsion an Plastik von hämatopoetischen Zellen befreiten Zellen zur Bereitstellung einer ausreichenden Zellzahl zunächst einer weiteren Passagierung unterzogen (Passage 1). Zur Überprüfung des chondrogenen, osteogenen und adipogenen Differenzierungspotenzials wurden auf Zell-Aliquots wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben spezifische Differenzierungsprotokollen angewendet. Nach drei Wochen unter Bedingungen der adipogenen Differenzierung (s. 2.3.3) ließen sich die in den Zellen gebildeten typischen, Fett enthaltenden Vesikel mit der Red O-Färbung (s. 2.6.5) einfärben (Abb. 17 B). Ebenso gelang nach drei Wochen unter Bedingungen osteogener Differenzierung (s. 2.3.4) mit der von Kossa-Färbung (s. 2.6.6) der Nachweis von Ca-Ablagerungen als ein Hinweis für die Bildung von Osteoblasten (Abb. 17 D).

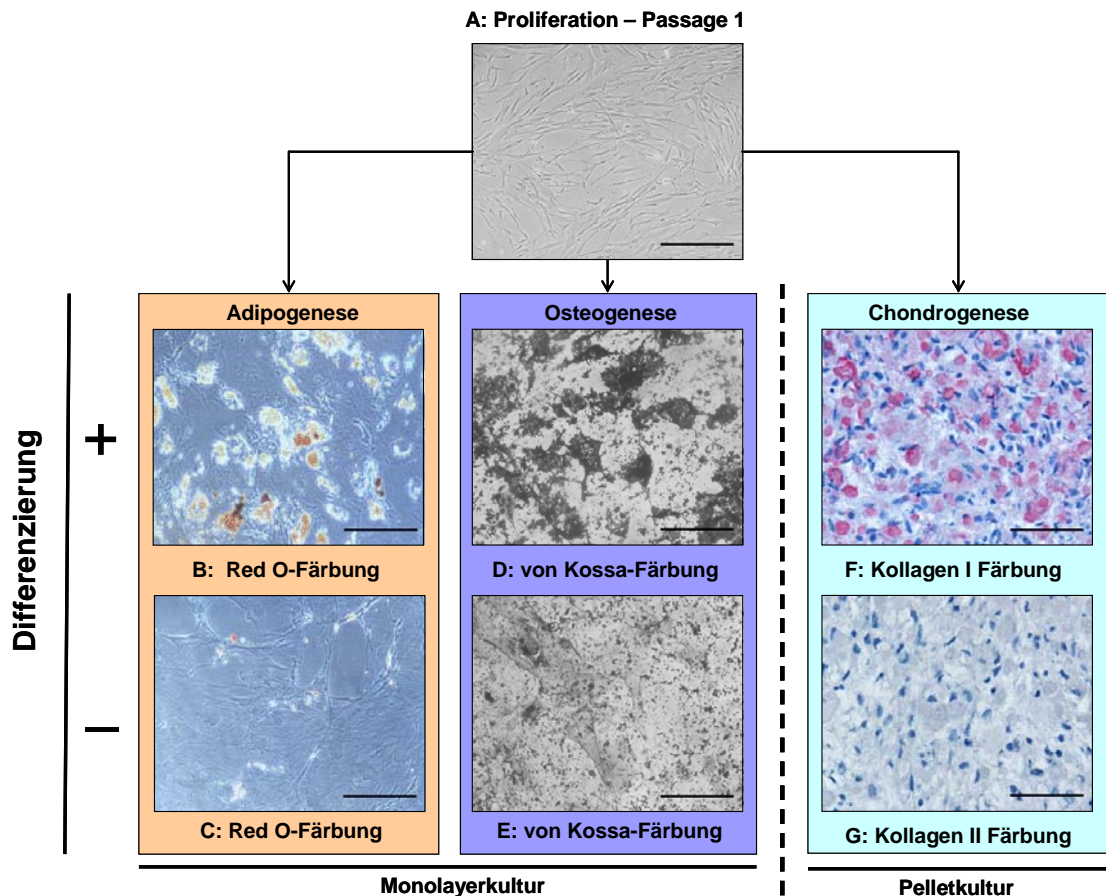


Abbildung 17: Tripotenz der Zellen nach Passage 1

Die Tripotenz der Zellen nach Passage 1 ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren in der Proliferationsphase mit einer Aussaatdichte von 1000 Zellen pro cm^2 wurde mit Differenzierungsassays bestätigt. Maßstabballen: 200 μm .

A: Morphologie der Zellen vor der Differenzierungsassays.

B: Die Red O-Färbung zeigt Fettdepots in den Zellen nach 3 Wochen adipogener Differenzierung.

C: Kontrolle der adipogenen Differenzierung.

D: Die Osteogene Differenzierung konnte nach 3 Wochen durch Anwesenheit von unlöslichen Kalziumsalzen mithilfe der von Kossa-Färbung nachgewiesen werden.

E: Kontrolle der osteogenen Differenzierung.

F und G: Für die Chondrogenese wurden die Zellen aggregiert und 3 Wochen lang in Gegenwart von TGF- β 3 und Dexamethason sowie anderen Standardzusätzen (s. 2.3.1) kultiviert. Der Nachweis der chondrogenen Differenzierung erfolgte durch eine immunohistologische Färbung gegen Kollagen I und II sowie auch eine GAG-Bestimmung (G/D Verhältnis = 1,7 [ng/ng]).

Zur Untersuchung des chondrogenen Differenzierungspotenzials wurden die Zellen zur Initiierung intensiver Zell-Zell-Kontakte in Pellets zentrifugiert und für 3 Wochen in Gegenwart geeigneter Wachstumsfaktoren wie TGF- β 3 und Dexamethason kultiviert. In aus den Pellets gewonnenen Paraffinschnitten ließen sich mittels Immunanfärbung zwar geringe Mengen an Kollagen Typ I, nicht aber von Kollagen Typ II, das als chondrogener Marker dient, nachweisen. Zudem zeigten die Präparate nicht die für hyalinen Knorpel typische Morphologie, sondern ähnelten eher einer Zellaggregation ohne signifikante Anteile extrazellulärer Matrix. Dies wird auch durch die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der gebildeten Glykosaminoglykane bestätigt. Sie zeigten nur einen sehr geringen Anstieg des GAG/DNA-Quotienten (G/D Verhältnis von 0,0 auf 1,7 [ng/ng]).

Damit ergibt sich insgesamt der Eindruck, dass die gewonnene hMSC-Population wahrscheinlich zu wenig chondrogene Progenitorzellen enthält, um daraus unter den allgemein empfohlenen Bedingungen eine für das *Tissue Engineering* von Knorpel ausreichende Zahl von Chondrozyten zu erhalten.

3.2 Proliferationsphase – *in vitro* Vermehrung

3.2.1 Aussaatdichte und Vermehrungsfaktor

Eine Möglichkeit, aus der hMSC Population des Knochenmarks eine ausreichende Zahl von Zellen zu gewinnen, die sich chondrogen differenzieren lassen, ist die selektive Anreicherung schnell proliferierender, wenig differenzierter Stammzellen (Prockop et al., 2001). Erreicht werden kann dies durch maximale Stimulierung der Proliferation der hMSCs über mehrere Passagen, was gleichzeitig zur relativen Abnahme langsamer und unerwünschter, partiell differenzierter Zellen führt. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden zwei Methoden eingesetzt:

- a) Eine verringerte Aussaatdichte der Zellen
- b) Verwendung bestimmter mitogener Wachstumsfaktoren

Typische für primäre Chondrozyten optimale Aussaatdichten liegen bei etwa 5000 Zellen pro cm^2 . Werden diese Bedingungen auch zur Vermehrung von Stammzellen angewandt, sind die Ergebnisse unbefriedigend. Wird die Aussaatdichte jedoch um den Faktor 10 oder mehr reduziert, wird eine Zunahme der Zellproliferation beobachtet, die die Verluste als Folge der anfänglichen Verdünnung nicht nur kompensiert, sondern überschreitet. Zur Verifizierung dieser Zusammenhänge wurden isolierte hMSC nach Ablösung der adhärenz Stammzellen (Passage 0) mit unterschiedlichen Aussaatdichten (500, 1000 und 5000 Zellen pro cm^2) aber sonst gleichen Bedingungen proliferiert. Die Zellen wurden jeweils nach 2 Wochen trypsinisiert und erneut ausgesät. Die Zellzahl wurde nach jeder Passage bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

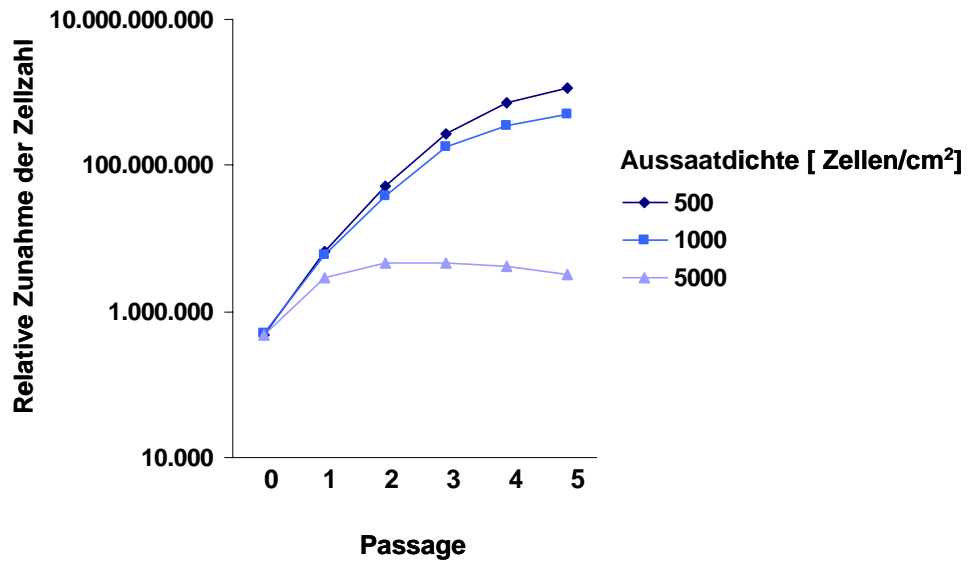


Abbildung 18: Auswirkungen der Aussaatdichte auf die Proliferationsrate der Zellen

Die Zellen wurden ohne WF während der ersten sechs Passagen mit unterschiedlichen Aussaatdichten proliferiert. Nach jeder Passage wurden die Zellen gezählt. Aussaatdichten: 500 Zellen pro cm²; 1000 Zellen pro cm²; 5000 Zellen pro cm². Die Zellen mit einer niedrigen Aussaatdichte vermehren sich stärker als die Zellen mit einer höheren Aussaatdichte. Dargestellt sind die Mittelwerte ($1 < n < 4$). Darstellung der Ordinate im logarithmischen Maßstab.

Es war festzustellen, dass der Vermehrungsfaktor der Zellen invers mit der Aussaatdichte korreliert. Daneben war auch nicht zu übersehen, dass die Proliferationsrate mit der Passagenzahl abnimmt, wobei dieser Effekt bei höheren Aussaatdichten wesentlich stärker ist. Versuche mit Aussaatdichten deutlich unter 500 Zellen pro cm² scheiterten.

3.2.2 Abhängigkeit der Morphologie der Zellen von der Aussaatdichte

Neben einer deutlichen Steigerung der Proliferationsrate hatte die Applikation einer so niedrigen Aussaatdichte scheinbar noch andere Effekte auf die Zellen. So wurde zunächst eine unterschiedliche Morphologie der Zellen beobachtet (Abb.19 A-C). In Abbildung 19 werden repräsentative Phasenkontrastaufnahmen von Zellen gezeigt, die mit Aussaatdichten zwischen 500 und 5000 Zellen pro cm² passagiert wurden. Man erkennt nur bei den niedrigen Aussaatdichten langgestreckte, spindelförmige Zellen. Im Vergleich dazu waren die Zellen größer und zeigten eine zerschnittene breit gestreckte Form, wenn sie mit einer Aussaatdichte von 5000 Zellen pro cm² ausgesät worden waren.

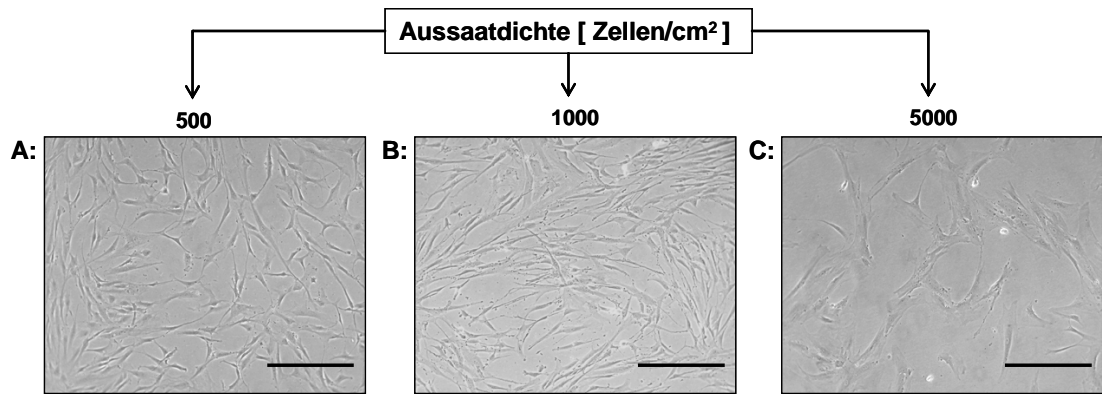


Abbildung 19: Abhängigkeit der Morphologie der Zellen von ihrer Aussaatdichte

Die Proliferation der Zellen ohne WF, aber mit unterschiedlichen Aussaatdichten beeinflusst die Morphologie der Zellen. Nach der ersten Passage waren bei einer Aussaatdichte von 500 Zellen pro cm² langgestreckte, spindelförmige Zellen zu beobachten. Eine ähnliche Morphologie war, wenn auch nicht in so stark ausgeprägter Form, noch bei einer Aussaatdichte von 1000 Zellen pro cm² zu sehen. In Gegensatz dazu waren die Zellen, die mit einer Aussaatdichte von 5000 Zellen pro cm² ausgesät wurden, größer und zeigten eine zerschnittene, breit gestreckte Form (Lichtmikroskopische Aufnahme, Phasenkontrast). Maßstabballen: 100 µm. Weitere Bilder sind in Anhang zu sehen.

Wurden die mit unterschiedlichen Aussaatdichten vermehrten Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie verglichen, konnte der visuelle Eindruck der morphologischen Unterschiede bestätigt werden (Abb. 20).

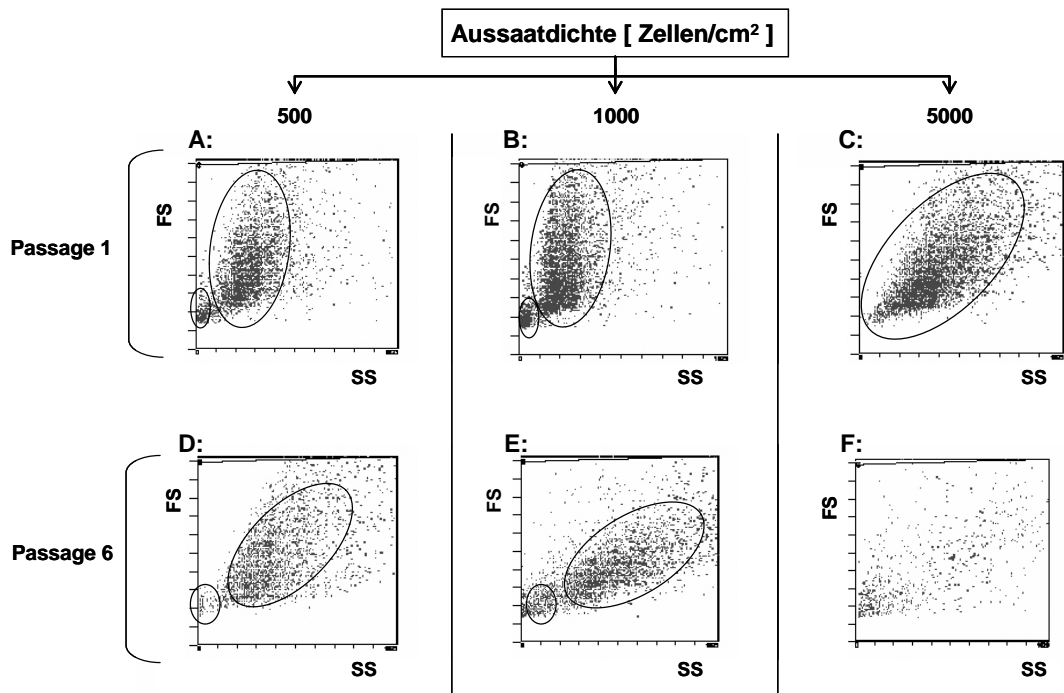


Abbildung 20: Aussaatdichte und Passagenzahl beeinflussen die Morphologie der Zellen

Morphologische Unterschiede in Größe und Form der Zellen, die durch Unterschiede in der Aussaatdichte über mehrere Passagen verursacht wurden, werden mit der Durchflusszytometrie – Analyse bestätigt. Bei Aussaatdichten von 500 Zellen cm² und 1000 Zellen cm² zeigen die Zellen nach Passage 1 und Passage 6 eine grundsätzlich ähnliche Aufteilung in zwei Subpopulationen. Im Unterschied dazu ist die Heterogenität der Zellen hinsichtlich Form und Größe bei einer Aussaatdichte von 5000 Zellen pro cm² deutlich größer. Diese Unterschiede sind nach Passage 6 noch stärker ausgeprägt. FS Scale = Größe der Zellen. SS Scale = Granularität der Zellen.

Die Abbildung 20 zeigt FS/SS-Diagramme von Zellen, die mit unterschiedlichen Aussaatdichten proliferiert wurden. Zellen mit niedrigen Aussaatdichten (500 und 1000 Zellen pro cm^2) weisen zwar eine breite Größenstreuung auf, haben aber insgesamt eine niedrige Granularität (Abb. 20 A und B). Das Ergebnis ändert sich deutlich, wenn die Zellen mit 5000 Zellen pro cm^2 ausgesät wurden. Jetzt werden mehr Zellen mit erhöhter Granularität beobachtet, was typisch für stärker differenzierte Zellen ist. Weiterhin ist nur bei den Zellen mit niedrigen Aussaatdichten eine separate Population von sehr kleinen Zellen mit gleichzeitig besonders niedriger Granularität zu erkennen (Abb. 20 A und 20 B vs. Abb. 20 C). Diese Fraktion wurde schon von anderen Autoren beobachtet und als RS-Zellen bezeichnet. Die unteren drei Bilder (Abb. 20 D – 20 F) zeigen dieselbe Analyse, jedoch von Zellen, die zuvor für sechs Passagen proliferiert wurden. Im Vergleich zum Ergebnis nach nur einer Passage hat die Granularität bei allen Aussaatdichten zugenommen und zeigt eine breitere Verteilung. Die Zellen mit den niedrigeren Aussaatdichten haben zwar die Einheitlichkeit beibehalten, haben sich so genannten RS-Zellen (*self renew* Zellen) in der Anzahl vermindert.

3.2.3 Einfluss mitogener Wachstumsfaktoren auf die Proliferationsrate

Es ist bekannt, dass die Gegenwart verschiedener mitogener Wachstumsfaktoren im Kulturmedium nicht nur die Proliferationsrate, sondern auch das Differenzierungspotenzial beeinflussen kann. Generell sind Wachstumsfaktoren erwünscht, die eine spontane Differenzierung während der Proliferation verhindern, da so die Pluripotenz maximal erhalten wird. Andererseits sind im konkreten Fall auch Wachstumsfaktoren erwünscht, die eine Vordifferenzierung in Richtung Chondrozyten zulassen oder erleichtern. Daher ist das Kriterium für die Auswahl geeigneter Wachstumsfaktoren nicht allein die optimale Stimulierung der Proliferationsrate, sondern auch, inwieweit damit die spätere Differenzierung zu Chondrozyten begünstigt wird. Mit diesem Ziel wurden einige Wachstumsfaktoren einschließlich einiger Kombinationen auf ihre Fähigkeit zur Unterstützung der Proliferation und Differenzierung zu Chondrozyten untersucht. Diese Wachstumsfaktoren bzw. deren Kombinationen haben sich als chondrogen positiv wirkend bei der Proliferation humaner Chondrozyten erwiesen. In Abbildung 21 sind zunächst die Effekte auf die Proliferationsraten der Zellen dargestellt.

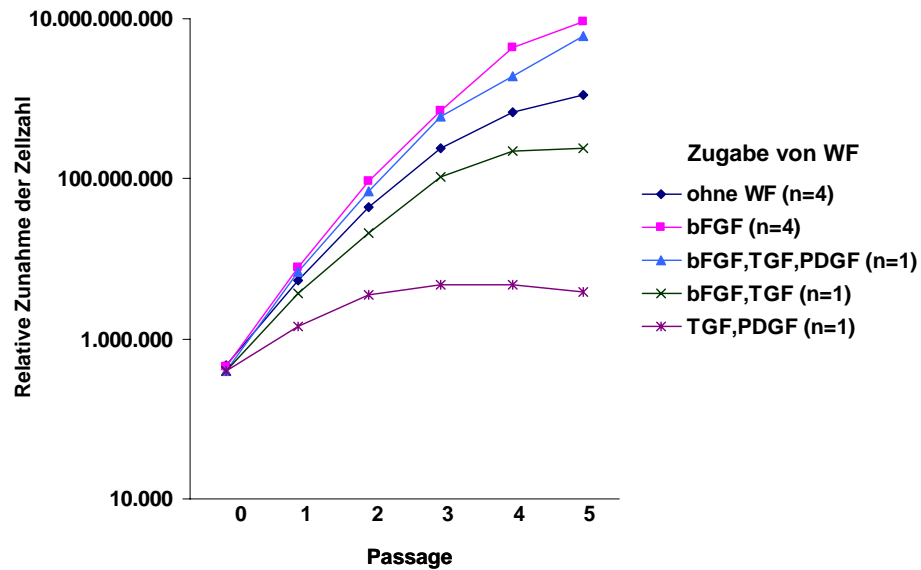


Abbildung 21: Einfluss mitogener Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der Zellen

Die Zugabe von unterschiedlichen WF führt bei gleicher Aussaatdichte von 500 Zellen pro cm^2 zu Unterschieden in der Proliferationsrate der Zellen. Eine höhere Proliferationsrate wird erreicht durch Zugabe von bFGF und einer Kombination von bFGF, TGF und PDGF. Eine Kombination von bFGF und TGF zeigt schlechtere Ergebnisse als die Kontrolle ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren. Die niedrigste Proliferationsrate wurde bei Zugabe von TGF und PDGF festgestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Darstellung der Ordinate im logarithmischen Maßstab.

Die höchste Proliferationsrate wird in Gegenwart von bFGF erreicht. Nur wenig schlechter schneidet eine Kombination der drei Wachstumsfaktoren bFGF, TGF- β 3 und PDGF ab. Allerdings scheint diese Kombination während der Proliferation gleichzeitig in erheblichem Ausmaß die Bildung von extrazellulärer Matrix zu stimulieren. Die offensichtlich von den Zellen sezernierte Matrix konnte allein durch Trypsinbehandlung der Kultur nicht entfernt werden. Ein Solubilisieren und Resuspendieren der Zellen gelang erst nach Behandlung der sedimentierten Zellpellets nach der Zellzentrifugation mit Kollagenase aber nicht Hyaluronidase, was als indirekter Hinweis auf die Bildung einer Matrix mit Kollagenanteil gewertet wurde. Die restlichen Kombinationen der Wachstumsfaktoren zeigten schlechtere Ergebnisse hinsichtlich der Zellproliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle, die ohne externe Wachstumsfaktoren kultiviert wurde. Daher wurde bFGF im Weiteren für die Vermehrung der Zellen standardmäßig angewendet.

3.2.4 Durchflusszytometrische Analyse der Zellen nach der Proliferationsphase

Ein wichtiger Hinweis für die Möglichkeit, dass mitogene Wachstumsfaktoren auch das Differenzierungspotenzial von Stammzellen beeinflussen können, kommt von durchflusszytometrischen Analysen unter Verwendung der für undifferenzierte hMSCs spezifischen Oberflächenmarker CD 90 und CD 105. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse einer vergleichenden Analyse von Zellen dargestellt, die mit und ohne bFGF proliferiert

wurden. Man erkennt, dass der Anteil von Zellen mit den genannten Markern deutlich kleiner ist, wenn die Proliferation der Zellen durch bFGF stimuliert wurde. Dabei bleibt zunächst offen, ob dieser Effekt für das Ziel, die chondrogene Differenzierung zu unterstützen, nützlich ist oder nicht.

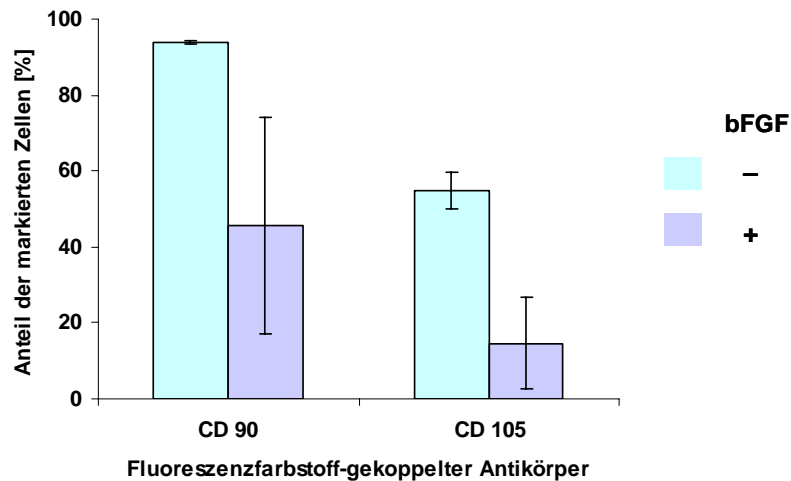


Abbildung 22: Einfluss der Zugabe von FGF auf die Präsenz der Differenzierungsmarker CD 90 und CD 105 während der Proliferation der Zellen

Eine Veränderung des Differenzierungsstatus der Zellen nach einer Passage lässt sich mithilfe der Durchflusszytometrie verfolgen. Der Anteil der CD 90- und CD 105- markierten Zellen ist dargestellt. Die Konzentration der für hMSCs charakteristischen Marker CD 90 und CD 105 nimmt nach einer Passage in Gegenwart von FGF sichtbar ab. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5 Wirkung mitogener Wachstumsfaktoren auf die Synthese von Glykosaminoglykanen in Pelletkultur ohne und mit Differenzierung

Auf Grund der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse wurde vermutet, dass in Gegenwart mitogener Wachstumsfaktoren proliferierende Zellen ein verändertes Differenzierungspotenzial zeigen. Um zu prüfen, ob einer der bereits zur Untersuchung der Proliferationsraten eingesetzten Faktoren möglicherweise die chondrogene Differenzierung unterstützt, wurde außerdem die Fähigkeit zur GAG-Synthese in Pelletkulturen in Abhängigkeit von den in der Proliferationsphase zugesetzten mitogenen Faktoren bestimmt (Abb. 23).

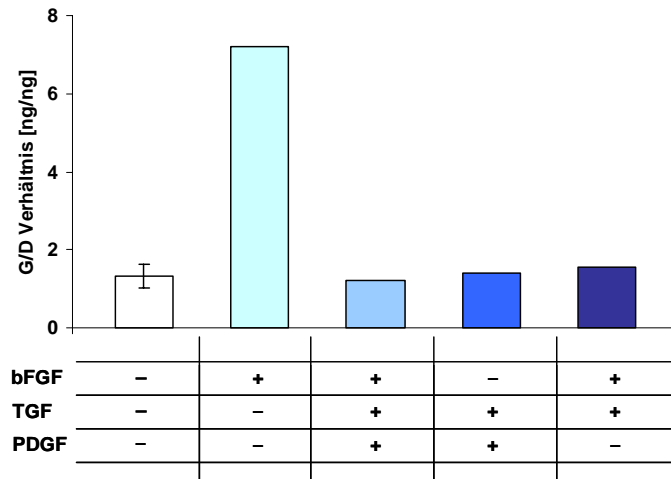


Abbildung 23: Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf die GAG-Synthese in Pellet-Kulturen nach Stimulierung der Proliferation

Die Zellen wurden in Gegenwart unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und mit einer Aussaatdichte von 500 Zellen pro cm^2 proliferiert und danach zu Pellets sedimentiert. Die GAG-Produktion wurde im Verhältnis zur DNA-Menge ermittelt (s. 2.7.1) und der Einfluss der in der Proliferationsphase applizierten Wachstumsfaktoren auf die GAG-Produktion in der Pellet-Kultur ist dargestellt. Von allen Kontrollen ohne Wachstumsfaktoren ist ein Mittelwert angegeben ($n=4$).

Die Pellet-Kulturen wurden mit identischer Zellzahl und sonst übereinstimmenden Kulturbedingungen angesetzt, um anschließend die Syntheserate an Glykosaminoglykanen zu bestimmen. Der einzige Unterschied waren die Bedingungen der vorausgehenden Proliferation der eingesetzten Zellen. Als Vergleich dienten in diesem Fall die Pellet-Kulturen von Zellen, die ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren proliferiert worden waren. In Abbildung 23 sieht man eine deutlich erhöhte GAG-Produktion in der Pelletkultur, wenn die Zellen unter der Zugabe von bFGF proliferiert worden waren.

3.2.6 Die Morphologie der Zellen, die für die chondrogene Differenzierung eingesetzt wurden

Die Ergebnisse der bisher beschriebenen Experimente unterstützen die Vorstellung, dass Bedingungen zur maximalen Stimulation der Proliferationsrate wie geringe Aussaatdichte und Einsatz von bFGF nicht im Widerspruch zur Erhaltung des chondrogenen Differenzierungspotenzials der Zellen stehen. Daher wurden im Folgenden Zellen immer unter den für die Proliferation optimalen Bedingungen (Aussaatdichte 500 Zellen/ cm^2 , Zugabe von bFGF) gezüchtet, wenn es um die optimale Erhaltung des chondrogenen Differenzierungspotenzials ging. Hilfreich waren hier Beobachtungen zur Morphologie der Zellen, die sich als stark abhängig von der aktuellen Proliferationsrate der Zellen erwies. So waren kleine, Kolonie-bildende Zellen nur bei hohen Proliferationsraten zu sehen (Abb. 43). Tauchten dagegen häufiger großflächige, ei- oder dreieck-förmige Zellen auf, konnte dies stets als Hinweis auf eine niedrige Proliferationsrate und ein vermutlich

unzureichendes chondrogenes Differenzierungspotenzial gewertet werden, wie sich bei den anschließenden Experimenten zur Differenzierung herausstellte.

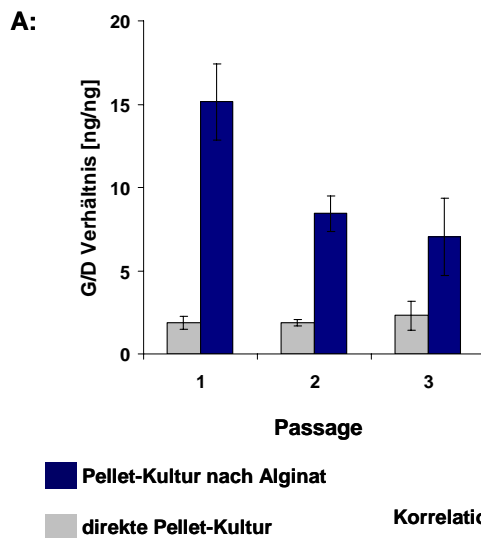
3.3 In Alginate-Gel eingebettete hMSCs als Differenzierungsmodell

Die Einbettung von Zellen in ein Alginate-Gel - im Folgenden als Alginate-Kultur bezeichnet – hat den Zweck, die Zellen räumlich voneinander zu trennen. Dadurch sollen insbesondere Zell-Zell-Kontakte vermieden werden ohne den Zugang löslicher Faktoren zu den Zellen spürbar einzuschränken. Es wird diskutiert, dass die Zell-Zell-Kontakte bei mesenchymalen Stammzellen vermutlich an der Initiierung der Differenzierung zu Chondrozyten beteiligt sind, während sie bei nativen Chondrozyten die Matrixsynthese auslösen. Beide Prozesse laufen nacheinander in so genannten Pellet-Kulturen ab, bei denen hMSCs zu einem Pellet zentrifugiert und anschließend bis zu drei Wochen mit geeignetem Medium kultiviert werden. Der Erfolg kann durch Quantifizierung der wichtigsten Produkte der gebildeten Knorpelmatrix - Kollagen Typ II und Glykosaminoglykane (GAG) – bestätigt werden. Alternativ können die in der Pellet-Kultur teilweise nebeneinander ablaufenden Prozesse der Differenzierung und der Matrixsynthese zeitlich getrennt werden, wenn man die für die Chondrogenese essentiellen Zell-Zell-Kontakte während der Differenzierung in einer Alginate-Kultur verhindert. Zur Beurteilung der Effektivität der Alginate-Kultur als Differenzierungsmodell muss der Erfolg durch Bestimmung der Matrixsynthese in einer sich anschließenden Pellet-Kultur mit der Matrixsynthese verglichen werden, die in Pellet-Kulturen von nicht vorher separat differenzierten hMSCs beobachtet wird (direkte Pellet-Kultur).

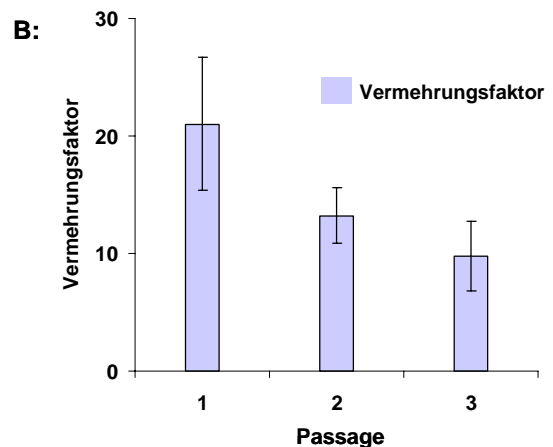
3.3.1 GAG-Synthese in Pellet-Kulturen mit und ohne vorherige Differenzierung in Alginate-Kultur

Um die GAG-Synthese in Pellet-Kulturen mit und ohne vorheriger Differenzierung in der Alginate-Kultur (Alginate-Kultur: Standardbedingungen s. 2.3.2) zu vergleichen, wurden Zellen nach Proliferation von der ersten bis zur dritten Passage unter identischen Bedingungen hinsichtlich der Mediumzusammensetzung und des Zusatzes von Wachstumsfaktoren (Proliferation: Zugabe von bFGF, Aussaatdichte 500 Zellen/cm²; Pellet-Kultur: Standardbedingungen s. 2.3.1) kultiviert und analysiert. In der Abbildung 24 A sind die auf die zelluläre DNA bezogenen GAG-Werte gegenübergestellt. Man erkennt, dass in den Pellet-Kulturen nach Differenzierung in Alginate-Kultur 3 – 5-mal mehr GAG gebildet wird als nach direkter Pellet-Kultur. Dabei scheinen die Unterschiede mit dem Abfall der Proliferationsrate in aufeinander folgenden Passagen zu korrelieren (Abb.24 B). Dies unterstützt die Vermutung, dass Proliferationsrate und Erhalt des (chondrogenen) Differenzierungspotenzials positiv miteinander korrelieren.

**GAG/DNA Analyse der Pelletkulturen
in Bezug auf die Passagezahl dafür verwendeter Zellen**



**Korrelation der Vermehrungsfaktoren
mit der Anzahl der Passagen**



**Korrelation der Vermehrungsfaktoren mit der
GAG - Bildungsrate**

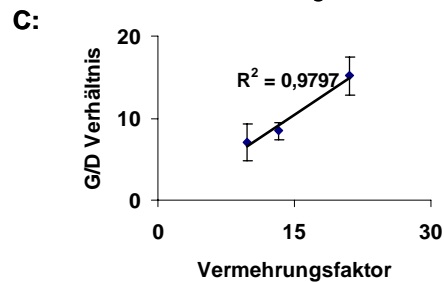


Abbildung 24: Vergleich des GAG/DNA-Quotienten nach direkter Pellet-Kultur und Pellet-Kultur nach Alginat-Differenzierung in Abhängigkeit von Passagenzahl und Proliferationsrate

A: Die GAG-Bildungsrate ist in Alginat – Pelletkultur von der Passagenzahl abhängig. Sie nimmt in den ersten 3 Passagen kontinuierlich ab, während sie bei direkter Chondrogenese praktisch unverändert bleibt.

B: Abnahme des Vermehrungsfaktors mit steigender Passagenzahl.

C: Positive Korrelation zwischen G/D Verhältnis und Vermehrungsfaktor. Eine positive Korrelation zwischen GAG – Bildung und Proliferationsrate wird durch die Regression bestätigt.

3.3.2 Optimierung der Bedingungen für die Differenzierung in der Alginat-Kultur

Zur Optimierung der Differenzierung der hMSCs in der Alginat-Kultur wurde die Matrixsynthese in einer anschließenden Pelletkultur in Abhängigkeit von

1. der Dauer
2. der Zelldichte
3. des Sauerstoffpartialdrucks

gemessen.

Die Kultur-Bedingungen für die einzelnen Phasen waren dabei:

Proliferation: Aussaatdichte: 500 Zellen pro cm^2 , mit bFGF

- Alginat-Kultur: IGF-1, TGF- β 3, Dexamethason mit Zusätzen (s 2.3.2).
- Pellet-Kultur nach Alginat: IGF-1, TGF β 3, Dexamethason mit Zusätzen (s 2.3.1).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 25-27 dargestellt.

Einfluss der Dauer der Alginat-Kultur auf den Erfolg der Differenzierung

Die Matrixbildung in der Pellet-Kultur nach Differenzierung ist von der Dauer der Differenzierungsphase in der Alginat-Kultur abhängig. Man entnimmt der Abbildung 25 A, dass die Matrixbildung in den ersten beiden Wochen stark ansteigt. Die Zellzahl, gemessen am DNA-Gehalt, sinkt gleichzeitig leicht nach drei Wochen in Alginat (Abb. 25 B).

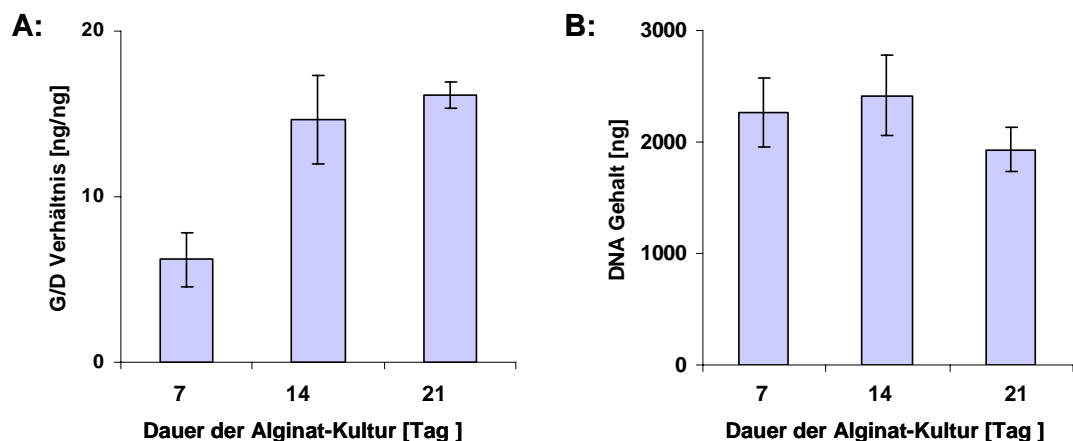


Abbildung 25: Die Wirkung der Dauer der Alginat-Kultur auf die Matrixbildung in der Pellet-Kultur nach Differenzierung in Alginat

Die Zellen wurden nach jeweils 7, 14 oder 21 Tagen in Alginat-Kultur unter Standardbedingungen zum Pellet sedimentiert und 3 Wochen zur Matrixbildung durch Zugabe von ChondrogenesemEDIUM stimuliert. Abschließend wurde eine GAG/DNA Analyse durchgeführt (n=4).

A: Das G/D Verhältnis steigt mit Zunahme der Dauer der Differenzierungsphase im Alginat.

B: Der DNA Gehalt zeigt eine leichte Abnahme der Zellzahl in der Pellet-Kultur nach 3 Wochen Differenzierung in Alginat-Kultur.

Es wurde das größte G/D Verhältnis in der Pellet-Kultur gezeigt, wenn die Zellen drei Wochen in der Alginat-Kultur waren. Dies könnte auf den Rückgang im DNA-Gehalt nach drei Wochen im Alginat zurückzuführen. Da die Zellen, die perizelluläre Matrix bilden, nicht mehr proliferieren können, wurde ein kleiner Abfall im DNA-Gehalt nach 3 Wochen in Alginat-Kultur positiv bewertet. Außerdem zeigte die auf den DNA-Gehalt bezogene GAG-Produktion in der dritten Woche keine großen Schwankungen. Daher wurde eine dreiwöchige Differenzierungsphase als optimale Kulturbedingung angesehen.

Die Zelldichte im Alginat-Gel und deren Auswirkung auf die Pellet-Kultur

Ein wichtiger Parameter für den Erfolg der Alginat-Kultur ist möglicherweise auch die anfängliche Dichte der in das Alginat-Gel einzubettenden Zellen. Da nicht auszuschließen ist, dass auch von den Zellen sezernierte parakrine Faktoren den Erfolg der

Differenzierung mitbestimmen, wurde der Effekt unterschiedlicher Zelldichten auf die GAG-Synthese in der anschließenden Pellet-Kultur bestimmt.

Die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse zeigen erhebliche Unterschiede beim Einsatz von ein, zwei und vier Millionen Zellen/ml.

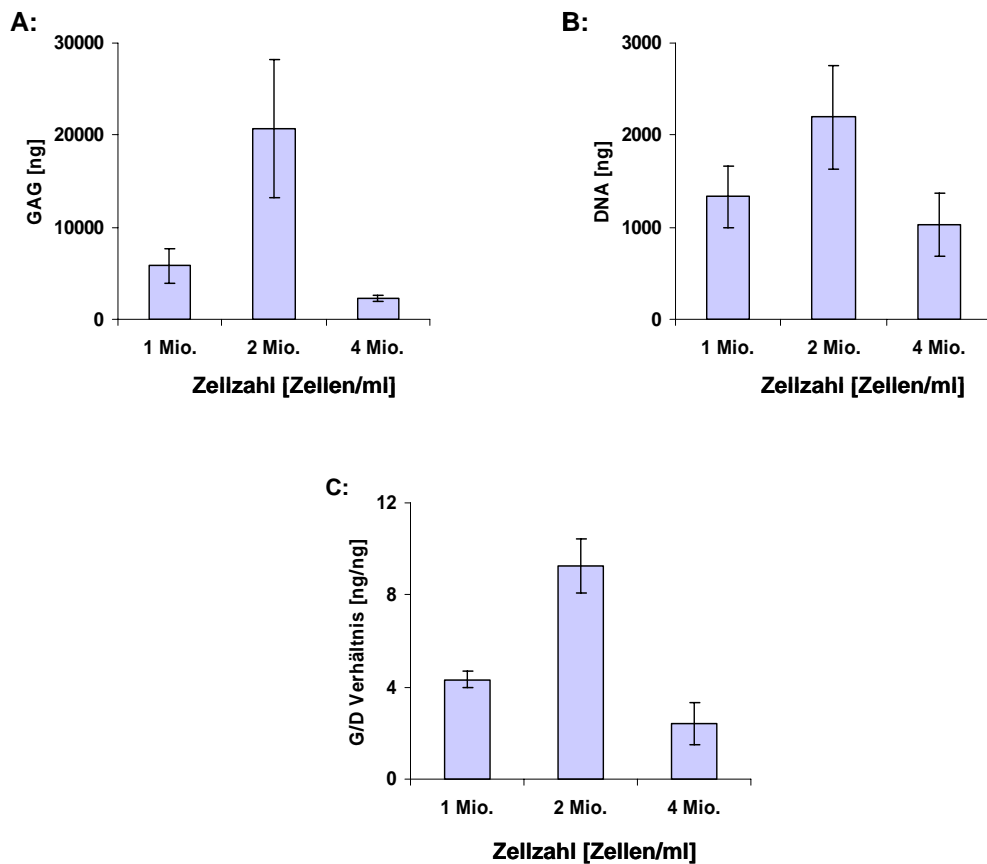


Abbildung 26: Abhängigkeit der Effektivität der Differenzierung im Alginate-Gel von der initial eingesetzten Zelldichte (n=3)

A: Die GAG- und DNA-Analyse der Pellet-Kultur nach Alginate zeigt, dass die optimale Zelldichte für eine Differenzierung der Zellen in Alginate-Kultur 2 Mio. Zellen pro ml Alginate ist.

Bei der Anwendung anderer Zelldichten während der Alginatephase wird ein suboptimaler Differenzierungsstatus erreicht und als Folge davon wird weniger Matrix in der Pellet-Kultur produziert. B: Die DNA-Analyse zeigt ebenso dass das Optimum für die Zellen bei 2 Mio. Zellen pro ml Alginate liegt.

C: Das G/D-Verhältnis bestätigt, dass die Zellen mit einer Dichte von 2 Mio. Zellen pro ml Alginate-Gel in der danach folgenden Pellet-Kultur die höchste GAG-Bildungsrate pro Zelle erreichen.

Die GAG-Produktion erreicht bei einer Zelldichte von 2 Mio. Zellen/ml ein Maximum. Dessen starker, überproportionaler Anstieg von 1 Mio. bei Zunahme der Zellzahl auf 2 Mio Zellen deutet auf eine Unterstützung durch parakrine Faktoren während der Differenzierung hin.

Der Rückgang im G/D Verhältnis um ca. Faktor vier bei 4 Mio. Zellen/ml kann nicht durch den Verlust der Zellen erklärt werden, da der DNA-Gehalt nur um ein Faktor zwei fällt. Gemessen an der auf den DNA-Gehalt bezogenen GAG-Produktion ist die mittlere Zelldichte (2 Mio. Zellen/ml) optimal.

Abhängigkeit der Differenzierung der hMSCs im Alginat-Gel vom Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase des Brutschanks

Es ist seit längerem bekannt, dass hyaliner Knorpel einen niedrigeren Sauerstoffpartialdruck aufweist als die meisten anderen Gewebe, einschließlich des Knochens. Daher wurde ebenfalls überprüft, ob die Differenzierung im Alginat-Gel durch eine Reduzierung des Sauerstoffpartialdrucks in der Umgebung gefördert wird. Wie Abbildung 27 zu entnehmen ist, wirkt sich bereits eine Reduzierung auf 10% O₂ positiv auf das G/D Verhältnis aus. Daher wurde diese Beobachtung bei der Festsetzung der optimalen Bedingungen für die Differenzierung berücksichtigt.

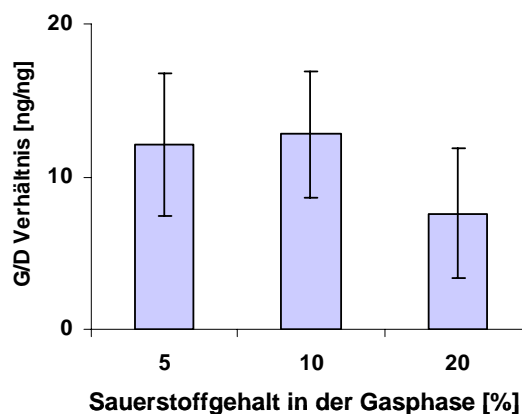


Abbildung 27: Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks in der Alginat-Kultur auf die GAG-Synthese in der anschließenden Pellet-Kultur

Das Differenzierungspotenzial der Zellen wird durch den Sauerstoffpartialdruck in der Alginatphase beeinflusst. Die Reduzierung des Sauerstoffgehalts in der Gasphase des Zellinkubators während der Alginat-Kultur beeinflusst den Differenzierungsstatus der Zellen und als Folge davon die Matrixbildung in der anschließenden Pellet-Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 unabhängigen Zellpräparationen.

3.3.3 Identifizierung der in der Alginat-Kultur gebildeten Chondrozyten

Als Kriterium für die Optimierung der Kulturbedingungen zur chondrogenen Differenzierung in der Alginat-Kultur wurde die Fähigkeit zur Bildung von Glykosaminoglykanen in einer nachfolgenden Pellet-Kultur verwendet. Dieses sehr aufwendige Verfahren war notwendig, weil alle Versuche, eine quantitative Korrelation zwischen den schon in der Differenzierungsphase in Alginat-Kultur gebildeten Knorpelkomponenten wie Kollagen Typ II oder Glykosaminoglykanen und dem Fortschritt der Differenzierung herzustellen, gescheitert sind. Es konnten lediglich qualitative Hinweise wie in der Abbildung 28 dargestellt, gewonnen werden. In Abbildung 28 A wurde die Existenz einer perizellulären GAG-haltigen Matrix direkt durch Anfärbung der im Gel eingebetteten Zellen sowie auch von Zellen nach deren Isolierung aus dem Alginat gezeigt.

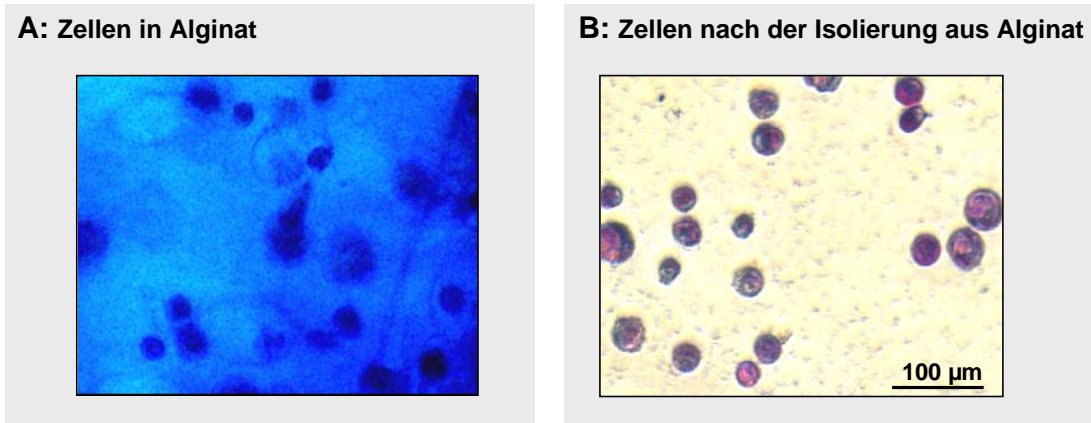


Abbildung 28: Direkter Nachweis der GAG-Bildung in der Alginate-Kultur

A: Die GAG-Bildung beginnt schon während der Differenzierungsphase in der Alginate-Kultur, was man mithilfe einer Alcian-Blau-Färbung der Alginate-Kugeln mit den eingebetteten Zellen erkennen kann. Jede Zelle bildet einen intensiver gefärbten perizellulären Hof. Dieser Hof weist auf die Existenz des so genannten Chondrons hin.

B: Der Hof ist auch noch nach der Freisetzung der Zellen aus dem Alginate-Gel zu sehen. Bei den aus dem Alginate-Gel isolierten Zellen wurde GAG mit 1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB) gefärbt.

Wegen der höheren Spezifität wurden zusätzlich immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Sie liefern direkt wertvolle und reproduzierbare Rückschlüsse auf den Erfolg der Differenzierung der hMSCs in der Alginate-Kultur. Entscheidend für den Erfolg der Differenzierung ist nämlich nicht die Menge der gebildeten Matrix-Komponenten, sondern welcher Anteil der Zellen der eingesetzten hMSC-Population im Laufe der Behandlung in der Alginate-Kultur die Fähigkeit zur Bildung der Knorpel-spezifischen Matrix-Komponenten gewinnt. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse stützen sich auf die für differenzierte Chondrozyten hochspezifische Eigenschaft, im Rahmen der Gewebebildung so genannte Chondrone zu bilden, die man sich als eine Art Hülle vorzustellen hat, welche die Chondrozyten umgeben. Zur immunhistologischen Analyse der Zellen, die unter optimierten Bedingungen in der Alginate-Kultur aus den hMSCs differenziert wurden, wurden diese nach der Solubilisierung aus dem Gel auf Objektträger sedimentiert (Cytospins) und mithilfe von Antikörpern gegen Kollagen Typ I, II und VI durch Fluoreszenzfarbstoff angefärbt (s. 2.5.5). Zur Identifizierung der Position der Zellen wurden die Zellkerne zusätzlich mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Eine Übersicht der abgefärbten Zellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, ist in Abbildung 29 zusammengestellt. Man erkennt, dass die Zellen mit allen drei Antikörpern spezifisch angefärbt werden, während in der Kontrolle ohne primären Antikörper nur die DNA der Zellkerne als Folge der gleichzeitigen DAPI-Färbung sichtbar wird. Berücksichtigt man weiterhin, dass die Anfärbung perizellulär am stärksten ist, was in der vergrößerten Darstellung in Abbildung 30 noch deutlicher wird, verdichtet sich die Vermutung, dass die im Alginate-Gel gebildeten perizellulären Hüllen echten Chondronen sehr ähnlich sind.

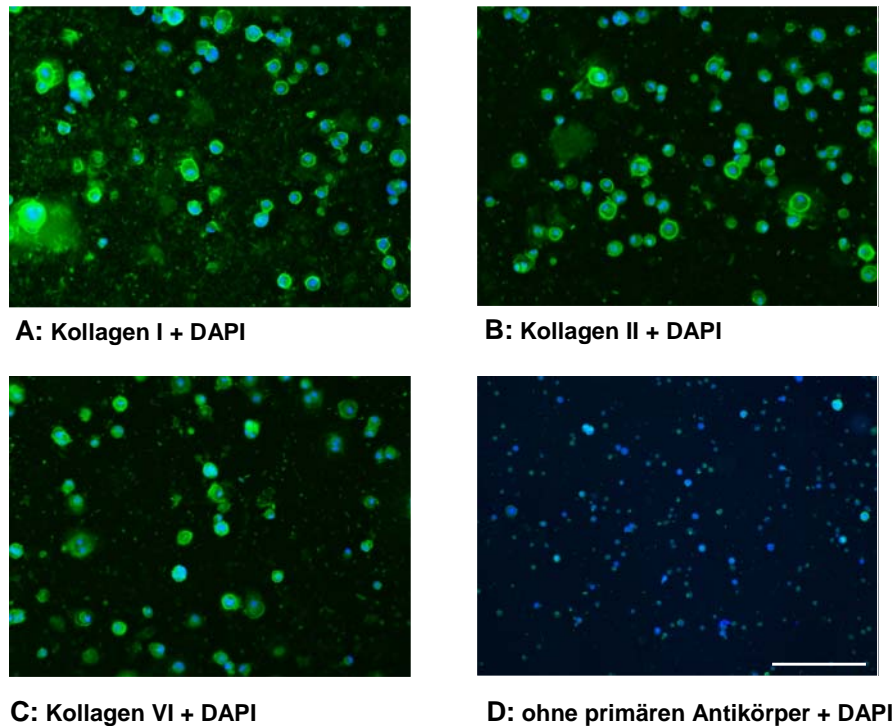


Abbildung 29: Direkter Nachweis der Kollagen-Bildung in der Alginate-Kultur

In der Alginate-Kultur differenzierte Zellen wurden mithilfe einer Behandlung mit Citrat aus dem Alginate-Gel befreit und anschließend für die immunologische Analyse auf Objektträger zentrifugiert. In den Übersichtsbildern erkennt man, dass die Zellen perizellulär neben den Kollagentypen I und II auch Kollagen Typ VI exprimiert haben. Unten rechts ist eine Kontrolle ohne primären Antikörper, in der man nur die mit DAPI gefärbten Zellkerne erkennt. Alle Zellen können anhand des gebildeten Kollagens als differenzierte Chondrozyten identifiziert werden. Maßstab Balken: 300 µm.

Diese sind den aus den hMSCs differenzierten Pseudo-Chondronen in Abbildung 30 A und C zum Vergleich gegenübergestellt. In Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren scheint Kollagen Typ VI die Zelle in beiden Fällen in etwas engerem Abstand zu umgeben als Kollagen Typ II, welches in einem etwas weiteren Abstand gefunden wird. Da weiterhin bekannt ist, dass Kollagen Typ VI im hyalinen Knorpel ausschließlich perizellulär, also in den Chondronen vorkommt, ist der Nachweis dieses Kollagentyps ein geeignetes Werkzeug mit besonders hoher Spezifität zur Identifizierung differenzierter Chondrozyten.

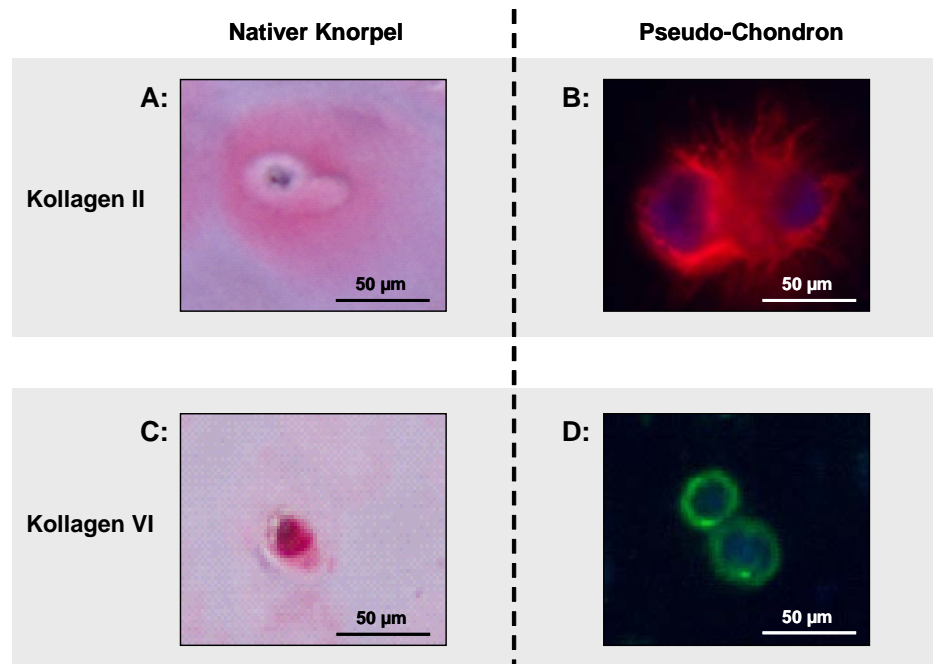


Abbildung 30: Der Vergleich der Struktur von nativen Chondronen und Pseudo-Chondronen aus dem Alginate-Gel

Die beiden Bilder links (Bilder A und C) zeigen die typische Topologie der Kollagen II und VI-Färbungen der Chondronen aus nativem Knorpel (Immunfärbung von Parafinschnitten). Die Bilder B und D rechts präsentieren die Fluoreszenzfärbung der Cytospins nach Isolierung aus dem Alginate-Gel. Die Färbung von Kollagen Typ II zeigt in beiden Fällen eine radial auslaufende Struktur (A und B). Im Gegensatz dazu ist die Kollagen Typ VI Färbung kompakter und näher an der Zelloberfläche lokalisiert (C und D).

Da von allen aus hMSCs entstehenden Zelltypen ausschließlich differenzierte Chondrozyten zur Bildung solcher Chondrone fähig sind, kann dieses Nachweissystem auch als spezifisch für die Bildung von differenzierten Chondrozyten aus Primärkulturzellen gewertet werden.

3.3.4 Die Quantifizierung der in der Alginate-Kultur gebildeten Chondrone

Für den potenziellen Einsatz von Chondrozyten zur *in vitro*-Herstellung von hyalinem Knorpel für therapeutische Zwecke ist die Bereitstellung einer homogenen Population differenzierter Zellen eine essentielle Bedingung. Daher ist die quantitative Differenzierung, das heißt die möglichst vollständige Überführung der eingesetzten hMSCs in differenzierte Chondrozyten, ebenso wichtig wie die oben gezeigte qualitative Identifizierung der Chondrone. Um festzustellen, welcher Anteil der aus dem Alginate-Gel freigesetzten Zellen während der Differenzierungsphase Chondrone gebildet hatte, wurden die immunologisch angefärbten Cytospins mithilfe der Software Lucia G (Nikon Japan) ausgewertet (s. 2.6.8), die die Bestimmung der Anzahl der Zellen mit einem minimalem Fluoreszenzsignal erlaubt. Wie Abbildung 31 A zeigt, ergab der Mittelwert von vier unabhängigen Analysen einen Anteil von knapp 98% Zellen, die neben einem mit DAPI gefärbten Zellkern gleichzeitig auch eine Kollagen Typ VI enthaltende, perizelluläre Hülle aufwiesen.

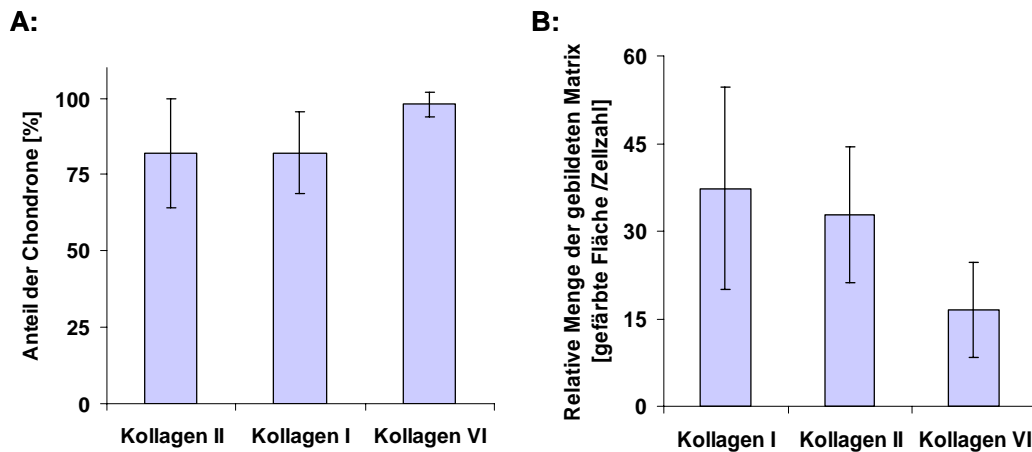


Abbildung 31: Quantitative Auswertung der im Alginat-Gel gebildeten Pseudochondrone

Die aus dem Alginat isolierten Pseudochondrone wurden mithilfe gegen Kollagen I, II und VI gerichteter, fluoreszenzmarkierter Antikörper markiert und quantitativ ausgewertet (n=4).

A: Praktisch alle Zellen haben einen perizellulären Hof von Kollagen Typ VI. Kollagen I und II wurden ebenfalls bei der Mehrheit der Zellen nachgewiesen.

B: Alle Zellen aus dem Alginat-Gel weisen eine Produktion der drei verschiedenen Kollagentypen auf. Die relative Menge der gebildeten Kollage zeigt weniger Kollagen VI als Kollagen I und II.

Der Anteil von Zellen, die auch Kollagen Typ II und Typ I enthielten, lag etwas niedriger. Es ist zu vermuten, dass dies die Folge der experimentellen Handhabung ist. Während der Präparation der Cytospins ist ein partieller Verlust der mechanisch empfindlichen Chondronhülle nicht vollständig zu vermeiden. Da die mit den Kollagentypen I und II anfärbten Teile weiter außen liegen, sind diese stärker durch mechanische Verluste beeinflusst.

3.3.5 Wirkung von Dexamethason bei der Differenzierung der eingesetzten hMSCs in der Alginat-Kultur

Die Anwesenheit von Glucocorticoiden (Dexamethason) wird übereinstimmend von vielen Autoren als sehr förderlich für den Erfolg der chondrogenen Differenzierung beschrieben. Daher wurden alle bisher beschriebenen Experimente unter Zusatz dieser vermeintlich förderlichen Bedingungen durchgeführt. Um zu verifizieren, ob dies auch tatsächlich für das verwendete Alginat-Kultur-System gilt, wurden zusätzlich einige vergleichende Messungen mit und ohne Zusatz der beiden genannten Faktoren durchgeführt.

Die unter Verzicht auf Dexamethason im Differenzierungsmedium gebildeten Chondrozyten wurden gegen Kollagen Typ I, II und VI mit Fluoreszenz markiert und die erhaltenen Resultate sind in Abbildung 32 zusammengefasst. Man erkennt zunächst in Abbildung 32 A, dass der Anteil der Chondron-bildenden Zellen von 100% auf rund die Hälfte sinkt, wenn man auf die Zugabe von Dexamethason verzichtet. Gleichzeitig erniedrigt sich die gefärbte Fläche (Matrixmenge) auf rund 10-30 %, wahrscheinlich als Folge einer verminderten Sezernierung der drei Kollagentypen I, II und VI (Daten nicht

gezeigt). Noch dramatischer ist der Effekt, wenn die Expression des Kollagen II-Gens mithilfe der qPCR untersucht wird. Hier wird nach Differenzierung in Gegenwart von Dexamethason rund 13-mal mehr mRNA in den Zellen gefunden. Dagegen hat das Weglassen von Dexamethason auf die Expression von Kollagen X als ein Marker für terminal differenzierte Chondrozyten und von Sox9, ein früherer Marker für die Chondrogenese, nur einen schwachen Effekt (Abb. 32 B).

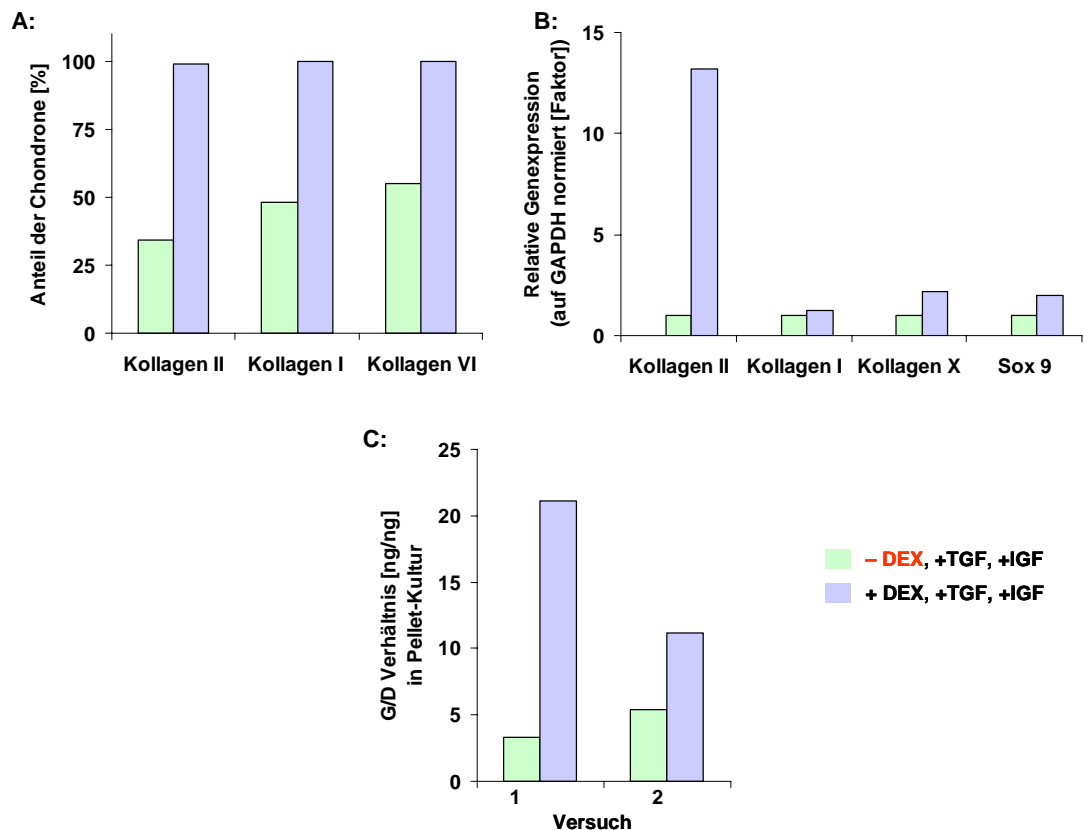


Abbildung 32: Auswirkung der Zugabe von Dexamethason auf die Differenzierung der Zellen in Alginate-Kultur

Die wichtige Rolle von Dexamethason für die Differenzierung der Zellen wurde mithilfe von computergestützter quantitativer Auswertung der Immunfluoreszenzmarkierung, qPCR und GAG/DNA-Analyse gezeigt (Daten von zwei unabhängigen Zellpräparationen).

A: Der Anteil der mithilfe der fluoreszenzgekoppelten Antikörper gefundenen Chondrone ist bezogen auf die DAPI-positiven Zellen dargestellt. Das Weglassen von Dexamethason in der Differenzierungsphase hat eine negative Wirkung auf die Chondronbildung.

B: Die relative Expression der Gene verschiedener Knorpelmarker ist dargestellt. Hier ist das in Abwesenheit von Dexamethason erzielte Ergebnis = 1 gesetzt.

C: In dieser Abbildung ist die Produktion von GAG bezogen auf den DNA-Gehalt in der Pelletkultur in Abhängigkeit davon gezeigt, ob die Differenzierung in Alginate in An- oder Abwesenheit von Dexamethason durchgeführt wurde (Doppelbestimmung).

Die Spätwirkung von Dexamethason in der Alginate-Kultur auf die GAG-Bildung in der Pellet-Kultur findet man in Abbildung 32 C. Das Weglassen von Dexamethason in der Alginate-Kultur wirkte bei zwei unabhängigen Versuchen negativ auf Matrixbildung in der anschließenden Pellet-Kultur.

3.3.6 Effekt von TGF- β 3 auf die Differenzierung der eingesetzten hMSCs in der Alginat-Kultur

Auch der Effekt des Weglassens von TGF- β 3 aus dem Differenzierungsmedium in der Alginat-Kultur wurde untersucht. Hinsichtlich der Bildung von Chondronen ist das in Abbildung 33 dargestellte Ergebnis nicht einheitlich.

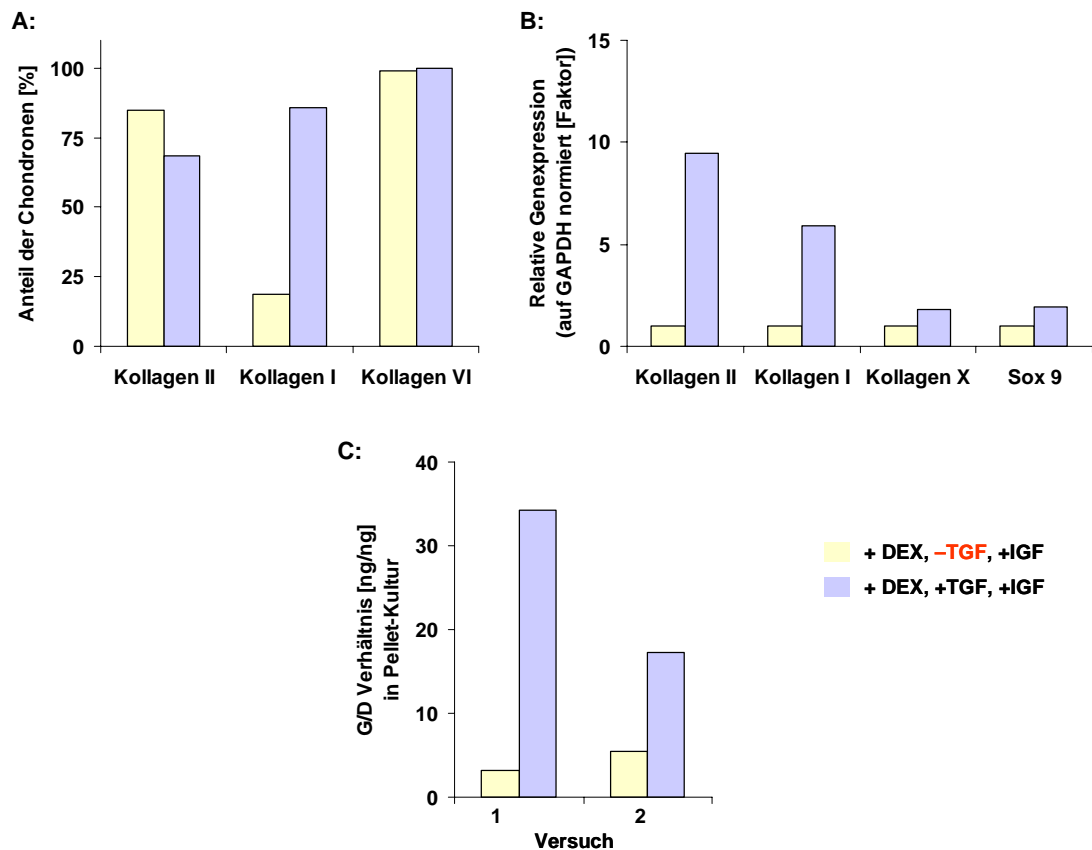


Abbildung 33: Auswirkung der Zugabe von TGF- β 3 auf die Differenzierung der Zellen in Alginat-Kultur

Die wichtige Rolle von TGF- β 3 für die Differenzierung der Zellen wurde mithilfe von Computer-gestützter quantitativer Auswertung der Immunofluoreszenzmarkierung, qPCR und GAG/DNA-Analyse gezeigt.

A: Der Anteil der gefundenen Chondrone ist bezogen auf die DAPI-positiven Zellen dargestellt. Das Weglassen von TGF- β 3 in der Differenzierungsphase hat eine negative Wirkung auf die Chondronbildung.

B: Die relative Expression der Gene verschiedener Knorpelmarker in Zellen aus der Alginat-Kultur. Hier ist das in Abwesenheit von TGF- β 3 erzielte Ergebnis = 1 gesetzt.

C: Die Produktion von GAG ist bezogen auf den DNA-Gehalt in der Pellet-Kultur in Abhängigkeit davon gezeigt, ob die Differenzierung in Alginat in An- oder Abwesenheit von TGF- β 3 durchgeführt wurde (Doppelbestimmung).

So scheint der Anteil von Chondronen mit Kollagen Typ VI und Kollagen Typ II nicht abzunehmen, wenn TGF- β 3 aus dem Differenzierungsmedium herausgelassen wird. Deutlich stärker wirkt sich das Weglassen von TGF- β 3 allerdings auf die Transkription des Kollagen II-Gens aus. Im Unterschied zum Kollagen Typ II werden für Kollagen Typ I übereinstimmende Verluste hinsichtlich der mRNA- und Protein-Synthese als Folge des

Verzichts auf die Zugabe von TGF- β 3 zum Differenzierungsmedium festgestellt. Die Änderungen in der Expression von Kollagen Typ X und Sox9 sind minimal. Auch die GAG/DNA-Analyse bestätigt, dass die Matrixbildung in der Pellet-Kultur beim Weglassen von TGF- β 3 in der Alginat-Kultur sinkt.

3.3.7 Wirkung von IGF-I auf die Differenzierung der eingesetzten hMSCs in der Alginat-Kultur

Die Wirkung der Weglassung von IGF-I aus der Alginat-Kultur während der Differenzierungsphase wurde auch mit drei verschiedenen Analysen untersucht. Das in Abbildung 34 A dargestellte Ergebnis zeigt, dass IGF-I ein sehr wirkungsvoller Stimulator für die Differenzierung der Zellen im Alginat-Gel in Hinsicht auf die Fähigkeit zur Matrixbildung in der anschließenden Pellet-Kultur ist.

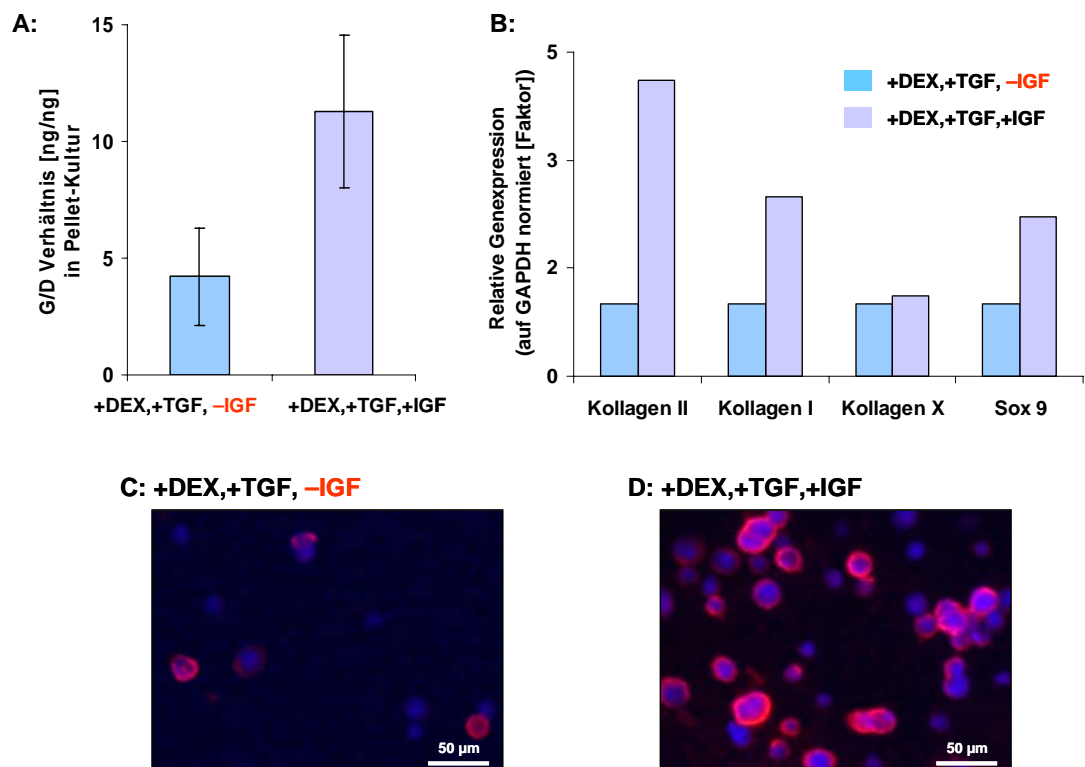


Abbildung 34: Wirkung von IGF- I auf die Differenzierung der Zellen in der Alginat-Kultur

Die Rolle von IGF-I für die Differenzierung der Zellen wurde mithilfe der GAG/DNA-Analyse, qPCR und Immunofluoreszenzmarkierung gezeigt.

A: Die Matrixbildung in der Pellet-Kultur nach der Differenzierung im Alginat-Gel in Abhängigkeit von IGF-I während der Differenzierung, gemessen als GAG/DNA-Quotient (n=5).

B: Die Expression der Gene einiger Knorpel-Marker in der Alginat-Kultur in Abhängigkeit von IGF-I. Die Expression in Abwesenheit des IGF-I wurde = 1 gesetzt.

C und D Immuno-Färbung von Kollagen Typ VI in Cytospinen nach der Differenzierung im Alginat-Gel mit und ohne Zusatz von IGF-I.

Dieser Befund wurde mit der Methode der qPCR praktisch bestätigt (Abb. 34 B). Die Expression von Kollagen Typ I und II sowie von Sox9 wird durch Zugabe von IGF-I in der Alginat-Kultur stimuliert. Gleichzeitig bleibt die mRNA-Menge von Kollagen Typ X unverändert.

Abbildung 34 C und D zeigen repräsentative Bilder der mit Antikörpern gegen Kollagen Typ VI markierten Chondrone, die nach Alginat-Kultur mit und ohne Zugabe von IGF-I gewonnen wurden. Man erkennt auch hier einen starken Effekt von IGF-I auf die Chondronbildung in der Differenzierungsphase. Die quantitative Auswertung war aufgrund der Visualisierung entbehrlich.

3.4 Die Matrixbildung in Pellet-Kulturen mit und ohne Differenzierung der hMSCs in Alginat-Kultur

Ziel der Differenzierung der eingesetzten hMSCs in der Alginat-Kultur war die Bereitstellung von Chondrozyten mit der Fähigkeit, sich durch Zell-Zell-Kontakte zur Bildung von Knorpelgewebe stimulieren zu lassen, ähnlich wie man es bei frisch aus *adultem* Gelenkknorpel isolierten Chondrozyten beobachtet. Zur Beurteilung der in der Alginat-Kultur erworbenen Eigenschaften soll das Verhalten der hMSCs mit dem von solchen Zellen verglichen werden, die nicht einer separaten Differenzierung unterworfen wurden.

3.4.1 Matrixbildung

Das Ergebnis der Bestimmung der während 3-wöchiger Pellet-Kulturen gebildeten Glykosaminoglykane (GAG) ohne und mit vorheriger Differenzierung in Alginat-Kultur ist in Abbildung 35 wiedergegeben. Die auf den DNA-Gehalt bezogenen GAG-Werte sind im Mittel um mehr als Faktor drei höher, wenn die hMSCs vorher einer separaten Differenzierungsphase unterworfen wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden bei dieser Gegenüberstellung identische Standardkulturbedingungen einschließlich der Auswahl und Konzentration der Wachstumsfaktoren verwendet.

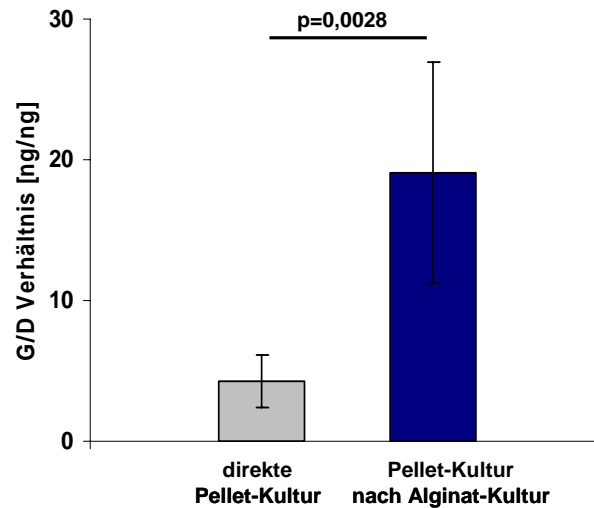


Abbildung 35: GAG/DNA Analyse der Matrixbildung in Pellet-Kultur mit und ohne Alginat-Phase

Der Vergleich der GAG-Bildung wurde in direkten Pellet-Kulturen (2-Phasen-Modell) und in Pellet-Kulturen nach Alginat-Kultur (3-Phasen-Modell) durchgeführt. Die zusätzliche Einschaltung der Alginat-Kultur zur Differenzierung bringt eine deutliche Zunahme in der GAG-Produktion der Zellen in der Pellet-Kultur mit sich. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student-T-Tests ermittelt. (Mittelwerte von 6 unabhängigen Versuchen der verschiedenen Zellpräparationen).

Zur Beurteilung der Auswirkung der separaten Differenzierung auf die Kollagensynthese wurden Western Blot-Analysen angefertigt (s. 2.5.3)

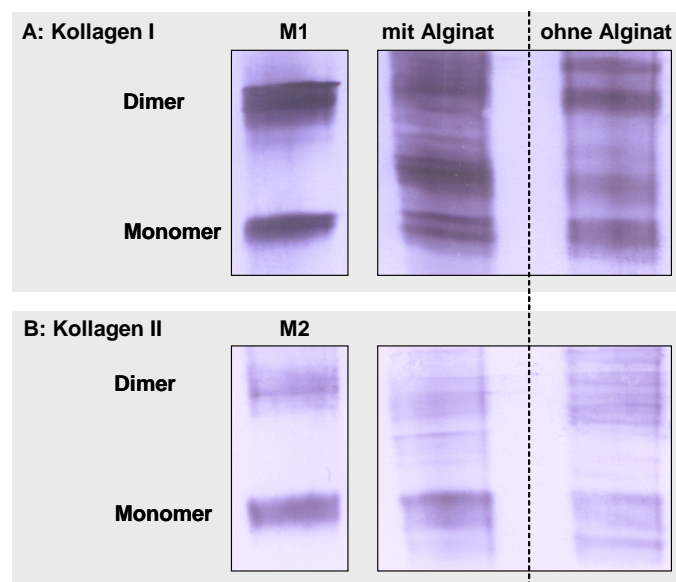


Abbildung 36: Kollagenbildung in Pelletkultur mit und ohne Alginat-Phase

Das Ergebnis einer repräsentativen Western-Blot-Analyse: Immunologische Identifizierung von Kollagen I und Kollagen II nach Extraktion aus Pellet-Kulturen mit und ohne zusätzlicher Differenzierung in Alginat-Kultur. Auf das Gel wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Marker: M1-Standard von Kollagen Typ I, M2 –Standard von Kollagen Typ II.

In Abbildung 36 ist eine etwas stärkere Bildung von Kollagen des Typs II zu erkennen, wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie bei der GAG-Bildung. Da Kollagen Typ II nach der Biosynthese vernetzt, kann das Ergebnis durch unterschiedlich effektive Extraktionen des Proteins aus dem Gewebe beeinträchtigt sein.

Daher wurden zusätzlich Paraffinschnitte angefertigt und immunhistologischen Färbungen unterworfen. In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass in der Pellet-Kultur ohne separate Differenzierung (direkte Pellet-Kultur) Kollagen Typ I und Kollagen vom Typ II relativ schwach angefärbt wurden. Dagegen findet man als Effekt der zusätzlichen Differenzierung (Pellet-Kultur nach Alginat) eine sichtbar schwächere Anfärbung von Kollagen Typ I und eine stärkere Anfärbung von Kollagen Typ II im Vergleich zum Kollagen Typ I.

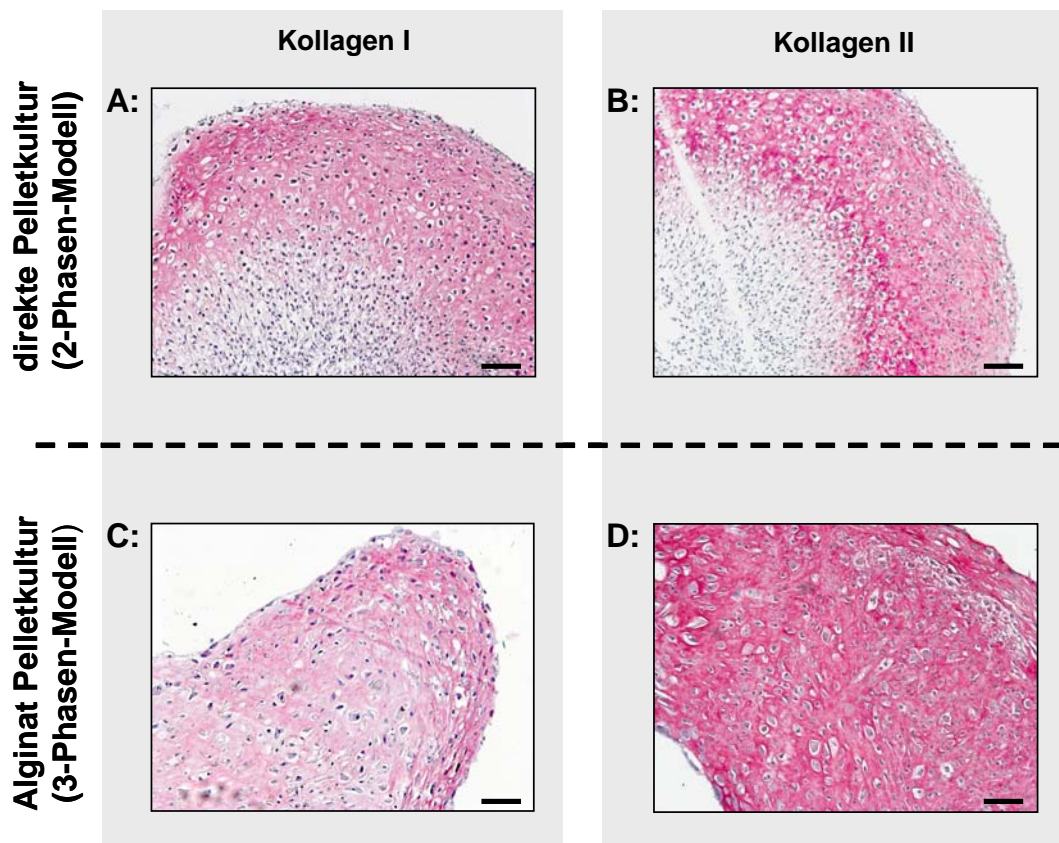


Abbildung 37: Immunhistologie des in Pellet-Kulturen gebildeten Knorpel-Gewebes ohne und mit zusätzlicher Differenzierung in Alginat-Pelletkultur

Histologische Schnitte von Pellet-Kulturen ohne (A und B) und mit separater Differenzierung im Alginat-Gel (C und D) wurden immunologisch mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I und Kollagen Typ II gefärbt. Nach zusätzlicher Differenzierung im Alginat-Gel ist die Bildung von Kollagen Typ II deutlich stärker als die von Kollagen Typ I. Maßstab: 100 µm.

3.4.2 Der Einfluss der chondrogenen Differenzierung in der Alginate-Kultur auf die Genexpression in der Pellet-Kultur

Um festzustellen, in welchem Ausmaß sich die Differenzierung der hMSCs in der Alginate-Kultur auf die chondrogen gewebespezifische Genexpression niederschlägt, wurden die Konzentrationen der mRNAs einiger Gene untersucht, deren Aktivierung für differenzierte Chondrozyten charakteristisch ist. Abbildung 38 zeigt die Menge der durch qPCR detektierten cDNAs der Kollagen-Typen I, II und X, sowie von Sox9, die ohne (graue Balken) und mit (blaue Balken, 2 Zellpräparationen) vorheriger Differenzierung gebildet wurden.

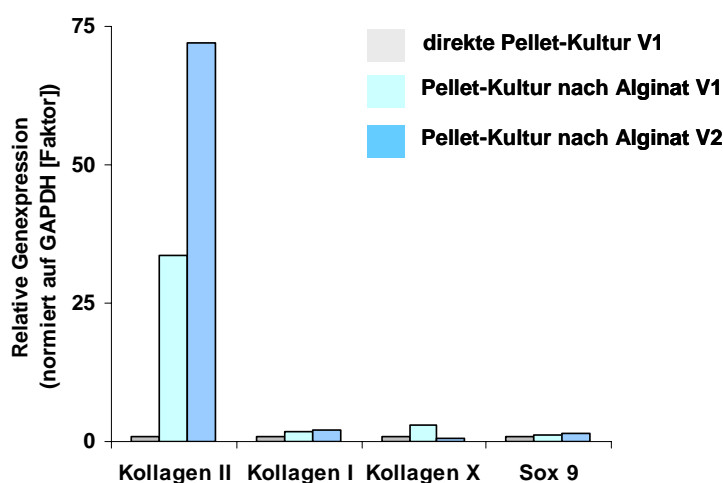


Abbildung 38: Genexpression einiger Targetgene in Pelletkultur mit und ohne zusätzlicher Differenzierung in der Alginate-Kultur

Dargestellt ist die auf GAPDH normierte Menge von mRNA-Molekülen (überschrieben in cDNA) der bezeichneten Gene in verschiedenen Pellet-Kulturen mit und ohne zusätzlicher Differenzierung in Alginate-Kultur. Die Expression in direkter Pellet-Kultur wurde = 1 gesetzt. Die Daten zeigten zwei unabhängige Zellpräparationen (V1 und V2). Pellet-Kultur und Alginate-Kultur wurden unter den Standardbedingungen durchgeführt.

Man erkennt, dass unter den konkreten Messbedingungen das für differenzierte Chondrozyten funktionell wichtige Kollagen-Gen des Typs II in sehr unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird. So wurden in Pellet-Kulturen als Folge der zusätzlichen Differenzierung in Alginate-Kultur 30-70-fach höhere Spiegel der betreffenden mRNA gemessen. Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang auch die starken Schwankungen der Expression, die bei zwei verschiedenen Zellpopulationen beobachtet wurden. Für die Gene der Kollagentypen I und X sowie für Sox9 werden im Vergleich dazu nur geringfügige Stimulierungen der Genexpression als Folge der zusätzlichen Differenzierung beobachtet.

3.5 Die Optimierung der Kulturbedingungen für die Matrixbildung in der Pellet-Kultur

Die zeitliche Trennung von Differenzierung und Matrixsynthese im Drei-Phasen-Modell bietet die Möglichkeit, beide Prozesse separat zu optimieren. Die in der Literatur beschriebenen Bedingungen hinsichtlich der Mediumzusammensetzung und der Zugabe von Wachstumsfaktoren entsprachen den Erfahrungen mit Pellet-Kulturen von undifferenzierten hMSCs. Da die Differenzierung in der Alginate-Kultur das Ziel hatte, die eingesetzten hMSCs bereits vor Beginn der Pellet-Kultur zu Chondrozyten zu differenzieren, sollten sich die Bedingungen für die optimale Matrix-Synthese in der Pellet-Kultur im Drei-Phasen-Modell weniger an den Empfehlungen für eine optimale Differenzierung orientieren, sondern eher Erfahrungen mit der Matrixbildung bei adulten Chondrozyten berücksichtigen.

3.5.1 Effekte von Dexamethason, TGF- β 3 und IGF-I in der Pellet-Kultur auf die Matrixsynthese

Primäre Chondrozyten, wie sie aus dem Gelenkflächenknorpel isoliert werden, haben ein großes Potenzial zur Bildung von hyalinem Knorpel, solange sie ihren differenzierten Phänotyp, zum Beispiel im Rahmen der Zellvermehrung in Monolayer-Kultur, noch nicht verloren haben (Dedifferenzierung). Werden differenzierte Zellen in Pellet-Kultur durch intensive Zell-Zell-Kontakte zur Matrixbildung stimuliert, wirken Faktoren wie Dexamethason und TGF- β nicht stimulierend, sondern hemmend. Um zu überprüfen, ob sich die unter den Bedingungen der Alginate-Kultur differenzierten Zellen in der Pellet-Kultur eher wie differenzierte Chondrozyten oder weiterhin wie undifferenzierte hMSCs verhalten, wurde die Matrixbildung in der Pellet-Kultur bestimmt, wenn Dexamethason, TGF- β 3 und IGF-I im Kultur-Medium fehlten.

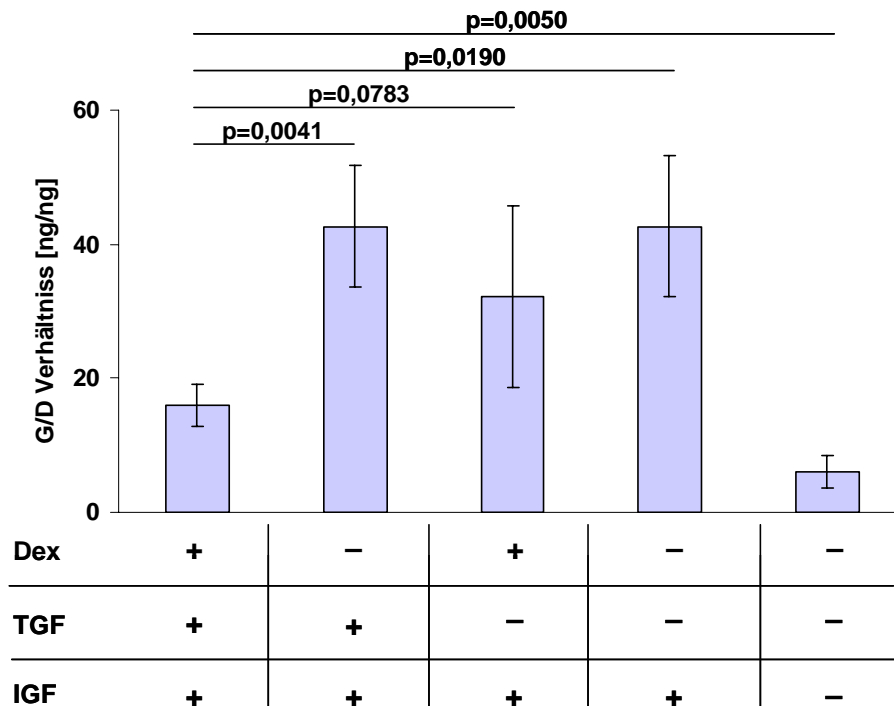


Abbildung 39: Effekt des Weglassens von Dexamethason, TGF- β 3 und IGF-I aus dem Kulturmedium der Pellet-Kultur auf die GAG-Bildung

Nach der Differenzierung in Alginat in Gegenwart der drei Faktoren Dexamethason, TGF- β 3 und IGF-I wurden Pellet-Kulturen in der Abwesenheit eines oder mehrerer Faktoren aus dem Kulturmedium durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student-T-Tests ermittelt und auf das G/D Verhältnis von den Versuchen mit DEX, TGF und IGF in der Pellet-Kultur bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Zellpräparationen ($n=4$).

In Abbildung 39 ist das Ergebnis der Bestimmung der GAG-Synthese in Pellet-Kulturen wiedergegeben, bei denen einer oder mehrere der in der Differenzierungsphase benutzten Faktoren fehlten. Man erkennt deutlich, dass die GAG-Synthese von der Abwesenheit von zwei der drei Faktoren profitiert. Wird gleichzeitig auf TGF- β 3 und Dexamethason verzichtet, ergibt sich zumindest hinsichtlich der GAG-Synthese jedoch kein additiver Effekt. Das Weglassen von IGF-I wirkt im Gegensatz dazu hemmend, wie es von differenzierten Chondrozyten beschrieben ist.

Die Ergebnisse der GAG-Analysen werden bestätigt von immunhistologischen Analysen der Kollagenbildung. In Abbildung 40 sind Paraffinschnitte von verschiedenen Pellet-Proben gezeigt, die jeweils mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I und II gefärbt wurden.

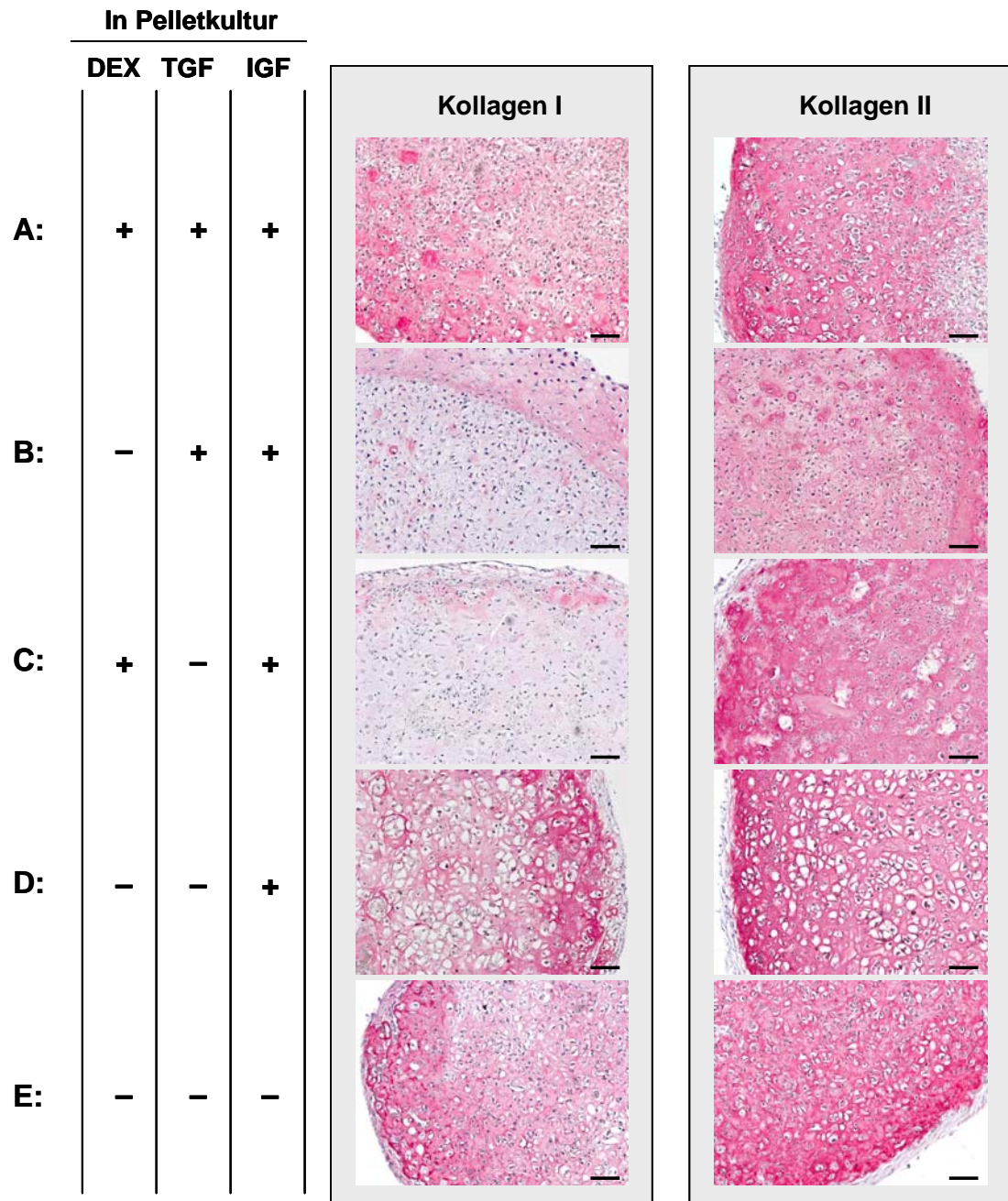


Abbildung 40: Die Auswirkungen von DEX, TGF- β 3 und IGF-I auf die Biosynthese von Kollagen Typ I und II in der Pellet-Kultur nach der Differenzierung in der Alginate-Kultur

Die nach der Differenzierungsphase (Standardbedingungen) aus dem Alginate-Gel freigesetzten Zellen wurden mit bzw. ohne einzelne oder mehrere Wachstumsfaktoren in der Pellet-Kultur für 3 Wochen kultiviert. Anschließend wurden die gebildeten Pellets in Paraffin eingebettet, geschnitten und gegen Kollagen Typ I bzw. II gefärbt. Maßstab Balken: 100 μ m.

Abbildung 40A zeigt das Ergebnis einer Pellet-Kultur nach der Alginatephase, bei der die hMSCs mithilfe aller drei Faktoren (Dex, TGF- β 3 und IGF-I) zur Differenzierung und Matrixsynthese gleichzeitig stimuliert wurden. Neben Kollagen Typ I ist die Bildung von Kollagen Typ II zu erkennen. Eine Verschiebung der Kollagen Typ II/I-Quotienten hin zu Kollagen Typ II ist bereits zu erkennen. Noch besser wird das Ergebnis hinsichtlich des Kollagens Typ II/I-Quotienten allerdings, wenn Dexamethason oder TGF- β 3 einzeln oder

zusammen während der Matrixsynthese in der Pellet-Kultur weggelassen wurden (Abb. 40 B, C und D). Hier scheint es einen deutlichen additiven Effekt hinsichtlich der Bildung von Kollagen Typ II zu geben. Andererseits steigt in diesem Fall unter Abwesenheit von TGF- β 3 auch das Niveau von Kollagen Typ I etwas an. Beim Weglassen aller drei Faktoren wurde eine starke Kollagen II Färbung und um etwas schwächere Kollagen I Färbung beobachtet (Abb. 40 E). Dieses repräsentative Ergebnis wird durch weitere Bilder im Anhang bestätigt.

3.5.2 Effekte von Dexamethason, TGF- β 3 und IGF-1 in der Pellet-Kultur auf die Genexpression

Die immunhistologischen Untersuchungen wurden durch qPCR-Analysen ergänzt. In Abbildung 41 sind die Daten der qPCR-Analyse von drei unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Zellpräparationen zusammengefasst. Anfällig dabei war, dass die Präparationen mit hohem Kollagen TypII/KollagenTyp I-Quotienten und niedrigen Kollagen Typ X-Werten aus den Kulturen mit hohem Vermehrungsfaktor in der Proliferationsphase gewonnen wurden.

+ DEX + TGF + IGF					
Versuch	Kollagen II	Kollagen I	Kollagen X	Sox9	VF*
S33	0,28	0,26	0,07	0,19	19,3
S32	0,24	0,33	0,03	0,25	18,5
S24	2,6	5,27	1,05	0,07	8,4
S33 W*	0,3	0,11	0,09	0,18	19,3
- DEX + TGF + IGF					
Versuch	Kollagen II	Kollagen I	Kollagen X	Sox9	VF*
S33	7,02	3,57	2,96	0,14	19,3
S32	3,05	0,50	0,54	0,37	18,5
S24	14,78	16,41	2,74	0,29	8,4
+ DEX - TGF + IGF					
Versuch	Kollagen II	Kollagen I	Kollagen X	Sox9	VF*
S33	3,80	1,36	1,81	0,34	19,3
S32	4,40	0,21	0,64	0,44	18,5
S24	16,86	12,47	5,70	0,36	8,4
- DEX - TGF + IGF					
Versuch	Kollagen II	Kollagen I	Kollagen X	Sox9	VF*
V24Y	5,04	8,59	4,08	0,25	8,4

Abbildung 41: Einfluss des Weglassens verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Genexpression wichtiger Knorpelmarker während der Matrixbildung in der Pellet-Kultur

Die aus Pellets isolierten mRNAs wurden in cDNAs überschrieben und mithilfe der qPCR-Methode analysiert. In der Tabelle sind die auf die GAPDH normierten Ergebnisse als Faktoren von 3 unabhängigen Versuchen (= unterschiedliche Zellpräparationen) zusammengefasst. Alle Pellets wurden nach dem Drei-Phasen-Modell gewonnen. Die einzelnen Ansätze unterscheiden sich durch die Gegenwart der angegebenen Wachstumsfaktoren in der Pellet-Kultur. Versuch S33W* zeigt die qPCR-Daten nach wiederholter Umschreibung der mRNA aus Versuch S33 in cDNA als Kontrolle für die Versuchsdurchführung. Gleiche Zellpräparationen wie in der Abbildung 30. VF: Vermehrungsfaktor (s. 2.2.1)

Um den Überblick zu erleichtern, sind in Abbildung 42 zusätzlich die durch jeden der drei Wachstumsfaktoren hervorgerufenen Veränderungen am Beispiel zweier Zellpräparationen noch einmal gegenübergestellt.

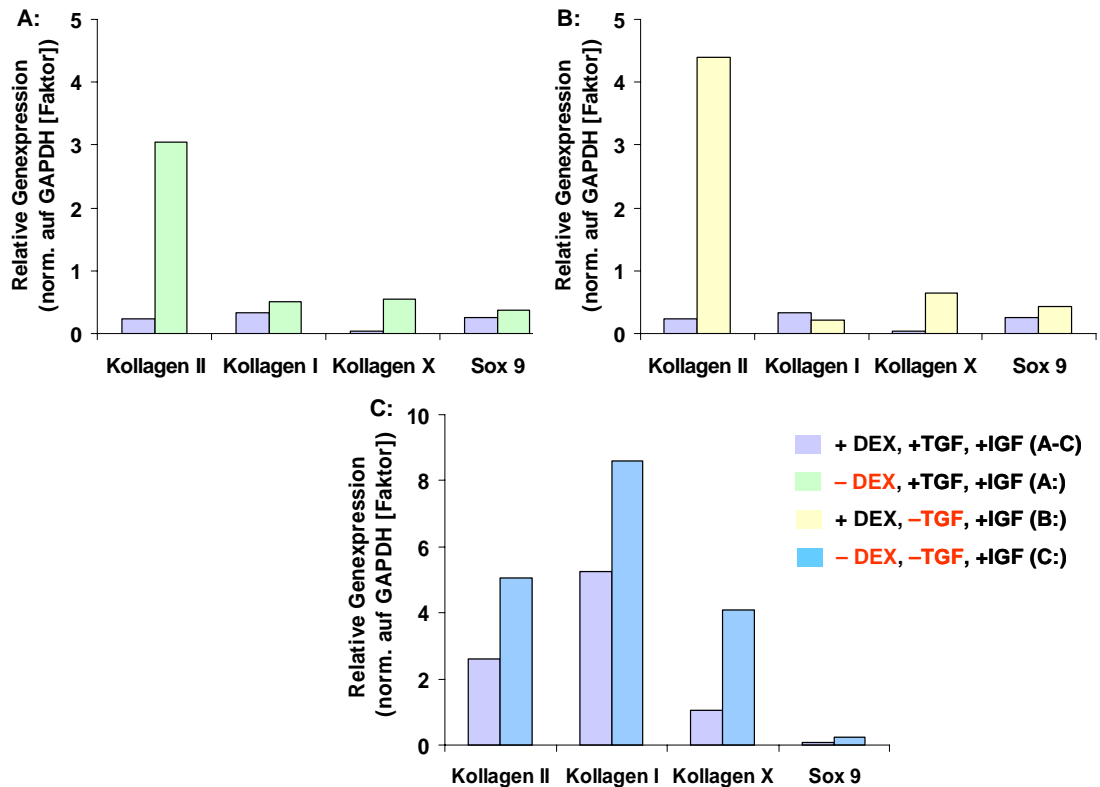


Abbildung 42: Einfluss von TGF- β 3, Dexamethason und IGF-I auf die Genexpression wichtiger Knorpelmarker

Die Ergebnisse der Zellpräparationen S33 und S24 aus der Abbildung 41 sind geordnet nach Wachstumsfaktoren in drei einzelnen Graphiken dargestellt.

Ganz analog zu den beobachteten Wirkungen auf das G/D Verhältnis (Abb. 39) wird durch selektives Weglassen von Dexamethason und TGF- β 3 aus dem Kulturmedium der Pellet-Kultur nach Alginat auch die Transkription des Gens von Kollagen Typ II stimuliert. Die Mengen der aus den Pellets isolierten mRNAs der Kollagen-Gene vom Typ I, II und X sowie des Sox9-Gens wurden in Abbildung 42 als Vielfaches der GAPDH-mRNA ausgedrückt.

Die gefundenen Veränderungen zeigen, dass das Gen des Kollagens Typ II als Folge des Weglassens von Dexamethason und TGF- β 3 im Kulturmedium der Pellet-Kultur nach Alginat offensichtlich erheblich aktiviert wurde. Parallel beobachtet man für das Kollagen Typ X ebenfalls eine Aktivierung um einen vergleichbaren Faktor, jedoch auf sehr viel niedrigerem Niveau. Im Gegensatz dazu werden für die Expression der Gene des Kollagen Typs I und des Transkriptionsfaktors Sox9 keine signifikanten Veränderungen als Folge des Weglassens von Dexamethason oder TGF- β 3 im Kulturmedium festgestellt.

Das gleichzeitige Weglassen von TGF- β 3 und Dexamethason hat offensichtlich keinen additiven Effekt auf die Genexpression. Dieses Ergebnis entspricht der G/D Zunahme bei der Kultivierung ohne Dexamethason und TGF- β 3 in Pellet-Kultur nach Alginat (Abb. 39). Die Expression der Gene von Kollagen Typ I und X wird ohne Zugabe von beiden Faktoren allerdings erhöht (Abb. 42 C). Die Expression von Sox9 zeigt in diesen Versuchen keine großen Änderungen.

Insgesamt stimmen diese Ergebnisse gut mit den gezeigten immunhistologischen Daten und den beschriebenen Effekten auf die GAG-Synthese überein. Als gemeinsames Fazit dieser Analysen lässt sich damit festhalten, dass die Matrixsynthese in der Pellet-Kultur in Gegenwart von Dexamethason und TGF- β 3 stark gehemmt wird, wenn die eingesetzten Zellen zuvor in Alginat-Kultur zu Chondrozyten differenziert wurden. Das bedeutet gleichzeitig, dass die beiden untersuchten Faktoren Dexamethason und TGF- β 3 auf die Differenzierung in der Alginat-Kultur bzw. die Matrix-Synthese in der anschließenden Pellet-Kultur entgegengesetzt wirken.

3.5.3 Abhängigkeit des Chondrogenese-Potenzials der *in vitro* vermehrten hMSCs vom Vermehrungsfaktor in der Proliferationsphase

Bei der Bestimmung der Genexpression zum Vergleich der Auswirkungen von Dexamethason und TGF in Pellet-Kultur fiel auf, dass der Vermehrungsfaktor während der Proliferation der Zellen einen Einfluss auf die Chondrogenese hatte. Wie bereits in Abbildung 24 gezeigt wurde, bedingt ein hoher Vermehrungsfaktor ein gutes G/D Verhältnis in Pellet-Kultur nach Alginat. Während der Kultivierung der Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen der Morphologie und dem Vermehrungsfaktor festgestellt. Abbildung 43 zeigt anhand von repräsentativen Beispielen typische morphologische Merkmale von hMSCs, die zu Beginn der Proliferationsphase beobachtet wurden. Zellen, denen vor der Abtrennung der hämatopoetischen Zellen länger Gelegenheit zur Adhäsion gegeben wurde, waren durchschnittlich wesentlich größer und flächiger. Daneben wurden häufig eiförmige und dreieckige Zellen beobachtet (Abb. 43 B). Wurde den Zellen nur 1-3 Tage die Möglichkeit zur Adhäsion gegeben, bevor der Zellüberstand abgenommen wurde (s. 2.2), zeigten diese stattdessen häufig eine Kolonie-bildende Morphologie (Abb. 43 A). In weiten Passagen konnte ermittelt werden, dass die Kolonie-bildenden Zellen einen wesentlich höheren VF aufwiesen.

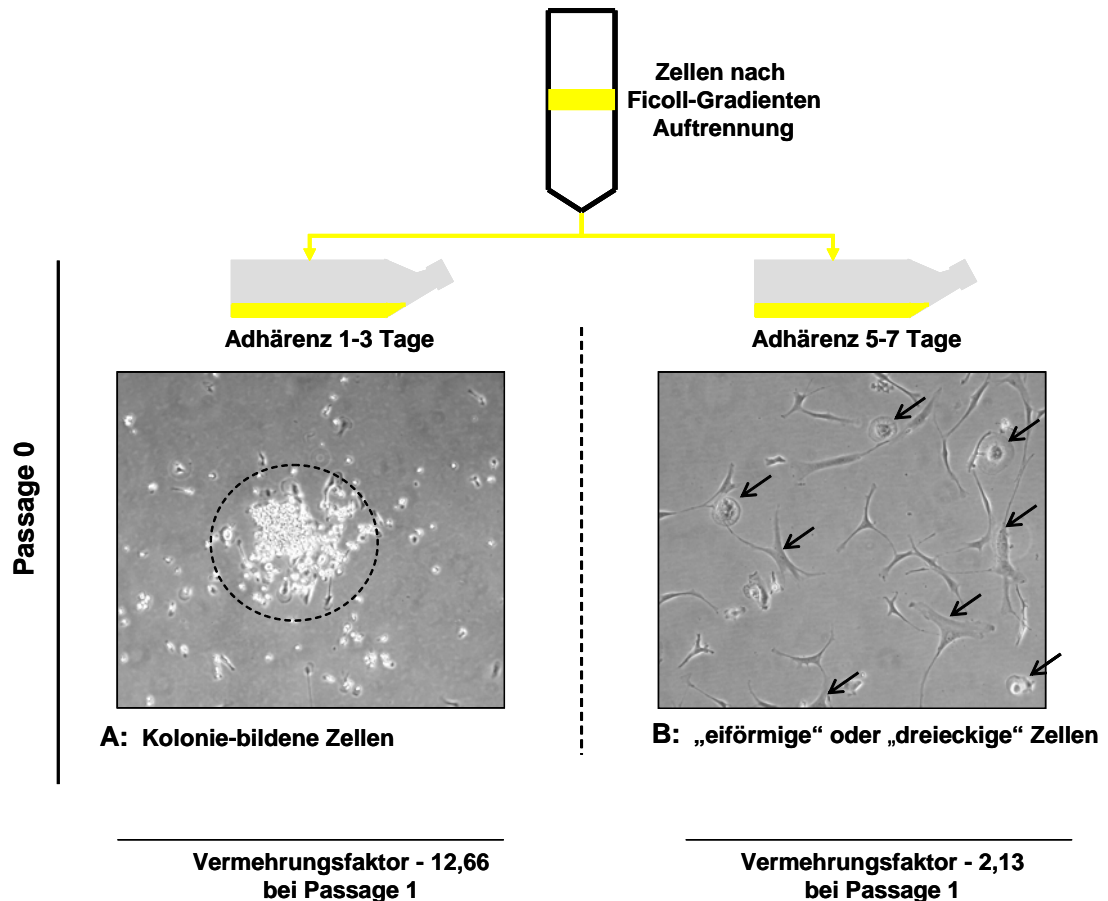


Abbildung 43: Der Zusammenhang zwischen Zellmorphologie einerseits und Adhärenzzeit und Proliferationsrate der Zellen andererseits

Alle Bilder wurden 7 Tage nach der Isolierung gemacht. Das Proliferationsmedium enthielt bFGF. Der Vermehrungsfaktor wurde nach Passage 1 bei einer Aussaatdichte von 500 Zellen/cm² und der Zugabe von bFGF errechnet. Maßstab: 100 µm (Lichtmikroskopische Aufnahme, Phasenkontrast).

Im Laufe der für die Arbeit durchgeführten Bestimmungen des Chondrogenese-Potenzials zeigte sich, dass sich die verschiedenen Parameter wie GAG/DNA-Verhältnis, Immunhistologische Kollagen-Färbungen und Genexpression von Knorpelmarkern gut reproduzieren ließen, wenn sie mit derselben Zellpräparation durchgeführt wurden. Erhöhte Schwankungen traten jedoch auf, wenn die mit verschiedenen Zellpräparationen erzielten Ergebnisse miteinander verglichen wurden. Bei der Suche nach den Ursachen fiel auf, dass Zellen mit der in Abbildung 43 A gezeigten Morphologie ein höheres und solche mit der in Abbildung 43 B gezeigten Morphologie in der Regel ein niedrigeres Chondrogenese-Potenzial aufwiesen. Eine mögliche Erklärung für die Schwankungen und ein Hinweis für einen Zusammenhang zwischen der Qualität der eingesetzten Zellen und dem beobachteten Chondrogenese-Potenzial liefert die in Abbildung 44 gezeigte Korrelation der GAG/DNA-Werte und dem während der Proliferation erreichten Vermehrungsfaktor. Man erkennt, dass in allen Fällen, in denen eine für die Matrixbildung förderliche Kombination von Wachstumsfaktoren in der Pellet-Kultur gewählt wurde, auch

ein deutlicher positiver Zusammenhang zwischen G/D –Verhältnis und Proliferationsrate besteht.

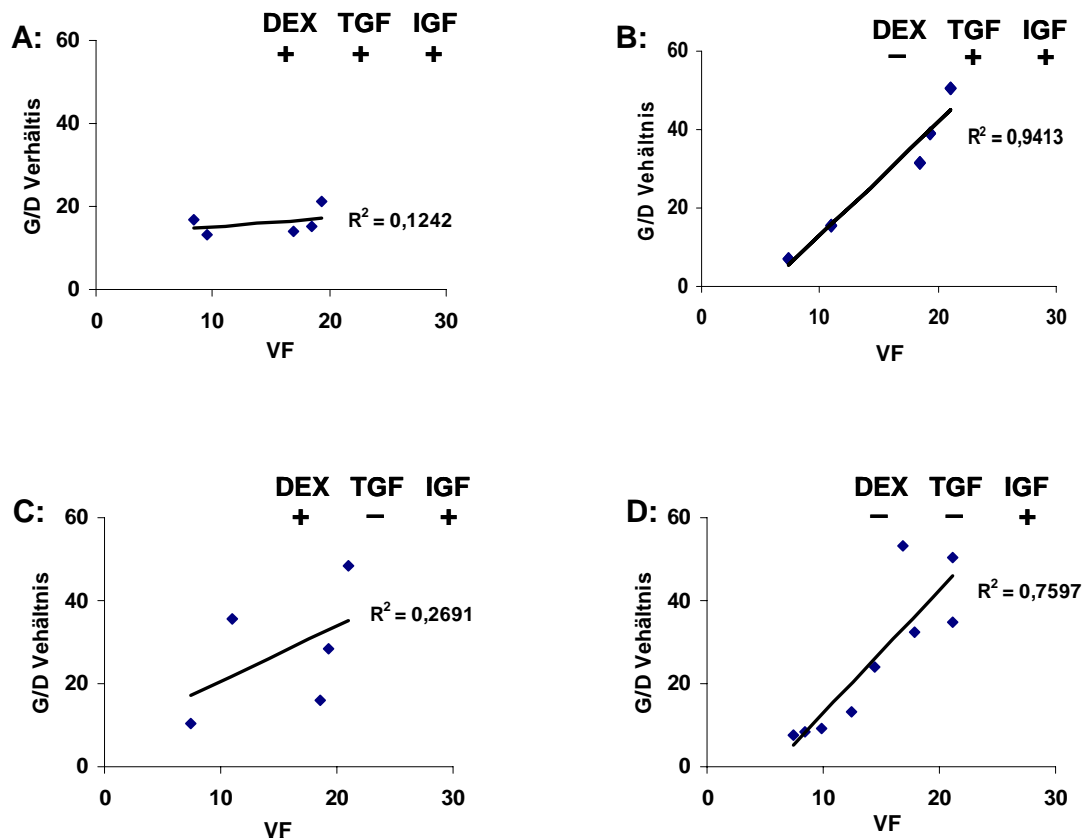


Abbildung 44: Der Zusammenhang der GAG–Bildung in der Pellet–Kultur und der in der Proliferationsphase erreichten Vermehrungsfaktoren

Das GAG/DNA-Verhältnis wurde als Maß für die im Drei-Phasen-Modell beobachtete Matrixbildung in der Pellet–Kultur jeweils für verschiedene Wachstumsfaktor-Kombinationen mit der in der Proliferationsphase erreichten Proliferationsrate (VF=Vermehrungsfaktor als Maß für die Proliferationsrate) korreliert.

3.5.4 Vergleich des in der Pellet-Kultur gebildeten Knorpelgewebes mit nativem, humanem Knorpel

Analyse der Genexpression

Abbildung 45 zeigt auf GAPDH-mRNA normierte Ergebnisse einer qPCR-Analyse einiger wichtiger Knorpelmarker. Verglichen werden die im nativen humanen Knorpel beobachteten Werte mit solchen, die mit Zellpräparationen mit hoher Proliferationsrate und mit unterschiedlichen Kombinationen verschiedener Wachstumsfaktoren im Drei-Phasen-Modell erzielt wurden.

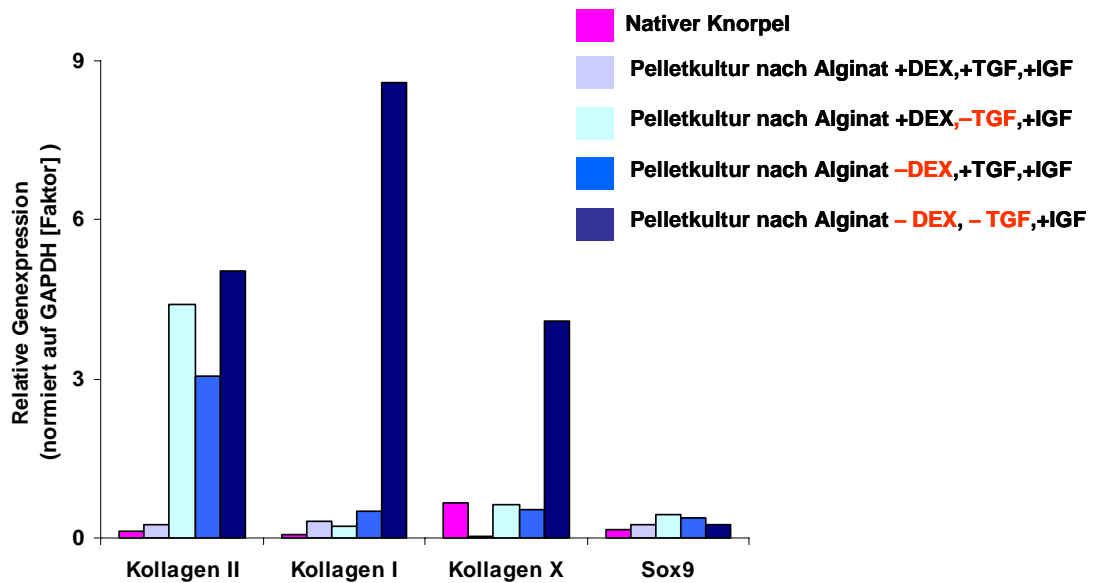


Abbildung 45: Vergleich der in Pellet-Kulturen nach dem Drei-Phasen-Modell erzielten Genexpression wichtiger Knorpelmarker mit der im nativen, humanen Knorpel

Die in Pellet-Kulturen in Gegenwart unterschiedlicher Wachstumsfaktoren nach dem Drei-Phasen-Modell gebildete mRNA wurde mittels qPCR-Analyse mit dem Level der mRNA aus nativem Knorpel verglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus Pellet-Kultur nach Alginat (Standardbedingungen) von zwei Zellpräparationen mit einem Vermehrungsfaktor von mindestens 9,2.

Die Abbildung 45 ist zu entnehmen, dass die Abwesenheit von Dexamethason und/oder TGF- β 3 zu einer sehr starken Induktion der Expression von Kollagen Typ II führt, die die im nativen Knorpel um den Faktor 20 bis 30 übersteigt. Allerdings bewirkt die gleichzeitige Abwesenheit beider Faktoren auch eine deutliche Gen-Aktivierung der Kollagentypen I und X. Da die Aktivierung dieser beiden Gene für die Bildung von hyalinem Knorpel nicht erwünscht ist, bringt die Abwesenheit nur eines der beiden Faktoren ein optimales Ergebnis. Dabei wird für Kollagen Typ X das gleiche Expressionslevel erreicht wie im nativen Knorpel. Diese Bedingungen sind ebenfalls für die Expression von Sox9 optimal, die im Vergleich zum nativen Knorpel noch leicht gesteigert werden kann.

Immunhistologische Analysen

Um abschätzen zu können, in welchem Maße sich die Technik der Pellet-Kultur eignet, aus den in der Alginat-Kultur differenzierten Chondrozyten hyalines Knorpelgewebe für den medizinischen Einsatz zu züchten, wurden die Ergebnisse immun-histologisch angefärbter Schnitte aus den Pellet-Proben mit solchen aus nativem, humanem Knorpel aus der Gelenkfläche verglichen. Abbildung 46 zeigt für beide Knorpelproben jeweils eine Anfärbung mit gegen Kollagen Typ I, Typ II und Typ VI gerichteten Antikörpern. Man erkennt im *in vitro* hergestellten Gewebe die unterschiedliche Lokalisierung der beiden Antigene. Während Kollagen Typ VI vorzugsweise perizellulär anzutreffen ist, findet sich Kollagen Typ II in der gesamten extrazellulären Matrix. Beim Vergleich mit den nativen

Proben fällt vor allem auf, dass die interzellulären Abstände in der *in vitro*-Probe noch nicht so groß sind wie im natürlichen Gewebe. Die geringere Intensität der Anfärbung durch die Kollagen Typ II-Antikörper im nativen Knorpel und nicht in der *in vitro*-Kultur deutet darauf hin, dass die Epitope der effektiveren Quervernetzung dieses Kollagentyps unterliegen und dadurch schlechter für die Antikörpermoleküle zugänglich sein können.

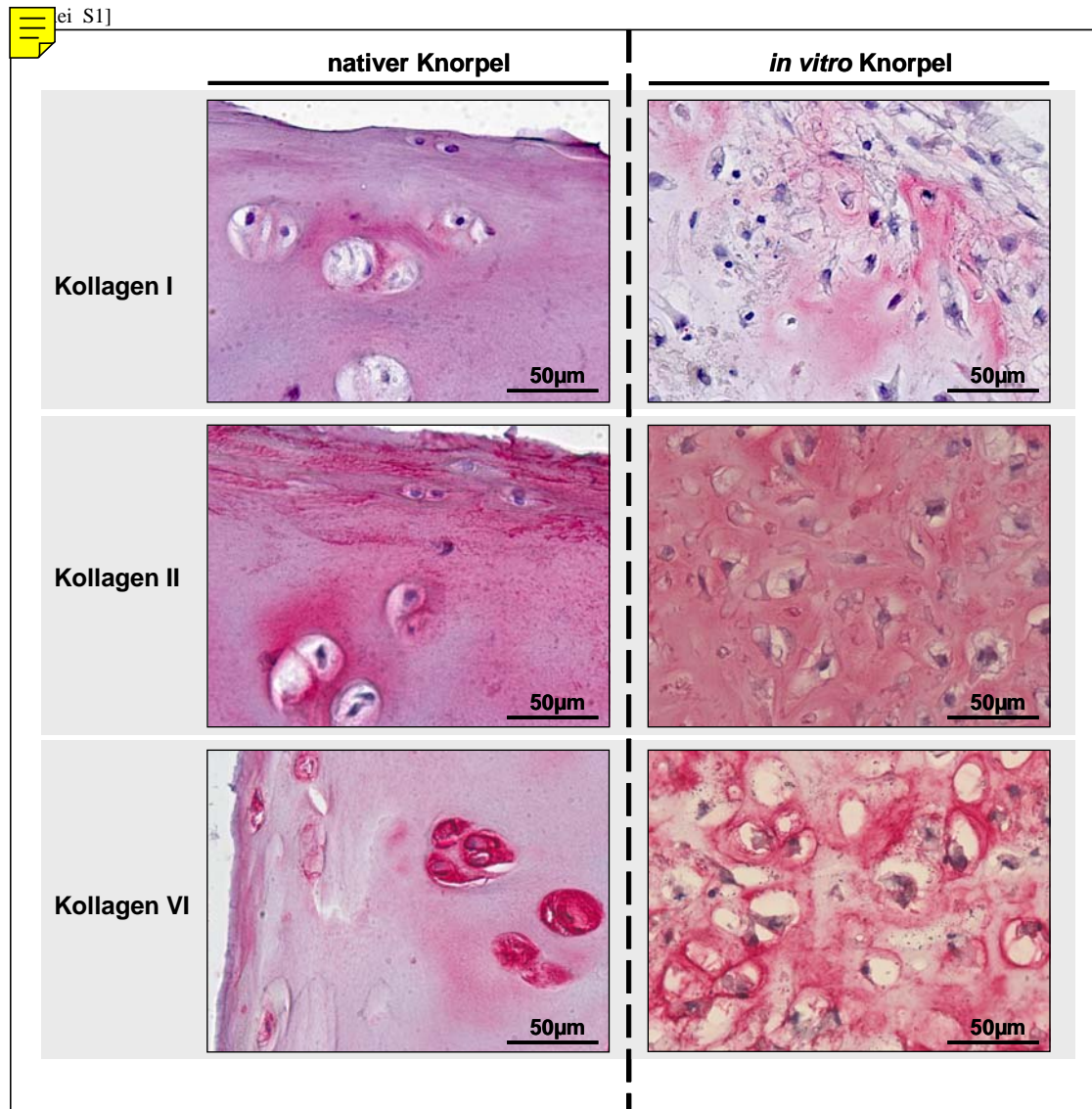


Abbildung 46: Vergleich immunologisch angefarbter histologischer Schnitte aus Pellet-Kulturen nach dem Drei-Phasen-Modell mit den Schnitten vom nativen, humanen Knorpel

Die Immunfärbungen der Paraffinschnitte wurden von nativem Knorpel und Pellet-Kulturen des Drei-Phasen-Modells mit Antikörpern gegen die Kollagen-Typen I, II und VI durchgeführt. Die Bedingungen für die Pellet-Kultur waren: Proliferation in Gegenwart von bFGF bei einer Aussaatdichte von 500 Zellen pro cm^2 ; Alginate-Kultur mit TGF- β 3, Dexamethason und IGF-I; Pellet-Kultur ohne Dexamethason, jedoch mit TGF- β 3 für die ersten 10 Tage und IGF-1 über 21 Tage.

Die im kurzen Zeitraum von nur drei Wochen *in vitro* gezüchteten Proben war die Gelegenheit zur starken Quervernetzung offensichtlich nicht gegeben. Die minimale

Anfärbung durch Kollagen Typ-I Antikörper sowie die unterschiedlichen mit Kollagen Typ II und Typ VI sichtbar gemachten Verteilungen sind jedoch typisch für hyalinen Knorpel. In diesem Kapitel wurden die Kulturbedingungen von einer dreiwöchigen Pellet-Kultur nach Differenzierungsphase im Alginat untersucht. Es konnten die Auswirkungen einiger Wachstumsfaktoren in dieser Matrixbildungsphase gezeigt werden. Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die mithilfe vom Drei-Phasen Modell erzielten Ergebnisse wesentliche Vorteile dieser Methode darstellen und hinsichtlich der Qualität *in vitro* gezüchteten Knorpels gegenüber den Ergebnissen des Zwei-Phasen Modells bessere Resultate zeigen.

4. Diskussion

4.1 Die Gewinnung der Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen *in vitro* untersucht. Voraussetzung für die Bearbeitung dieser Fragestellung war die Isolierung und Charakterisierung einer geeigneten Zellpopulation. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, können humane mesenchymale Stammzellen aus Aspiraten des Knochenmarks adulter Spender isoliert und *in vitro* expandiert werden. Eine allgemein akzeptierte, standardisierte Methode zur Isolierung der hMSCs aus dem Knochenmark gibt es zurzeit noch nicht (Haynesworth et al., 1996; Pittenger et al., 1999). Von anderen Autoren ist schon gezeigt worden, dass Art und Menge der gewonnenen Zellen von der Isolierungsmethode beeinflusst werden (Lange et al., 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden mit der am häufigsten verwendeten Methode gewonnen: die Auftrennung über einen Ficoll-Gradienten mit anschließender Selektierung der Zellen durch Adhärenz an die Plastikoberfläche üblicher Zellkulturgefäße. Zur Kontrolle dieser ersten Schritte wurden die Zellen zur Charakterisierung mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen untersucht. Dabei wurden vor allem auch die bereits in der Literatur beschriebenen morphologischen und immunologischen Parameter verwendet (Colter et al., 2001; Prockop et al., 2001).

Die auf der Abbildung 14 zu sehende graphische Darstellung nach Größe und Granularität spiegelt die bereits von verschiedenen Autoren beobachtete Heterogenität der Zellen wieder (Muraglia et al., 2000). Die Adhärenz der Zellen (Passage 0) mit anschließender gründlicher Spülung erniedrigt die Heterogenität der Zellpopulation erheblich. Die Wirksamkeit dieser vor allem zur Abtrennung der hämopoetischen Zellen dienenden Maßnahme wird durch Verwendung von CD 45 als Marker demonstriert.

Als positive immunzytochemische Marker für multipotente mesenchymale Stammzellen wurden nur zwei der in der Literatur beschriebenen Standardmarker, CD 90 und CD 105, eingesetzt (Jones et al., 2002). Daneben dienten STRO-1 als Marker für osteogene und CD 106 als Marker für chondrogene Progenitor-Zellen (Dennis et al., 2002; Diaz-Romero et al., 2005; Gronthos et al., 1994; Oyajobi et al., 1999). Dabei stellte sich in Übereinstimmung mit Aussagen anderer Autoren heraus, dass der Anteil der mesenchymalen Stammzellen bei frisch isolierten Zellen sehr niedrig ist. Mit STRO-1 konnte die Präsenz einer geringen Menge osteogener Progenitorzellen nachgewiesen werden, was auch mit Hilfe von RT-PCR-Analysen durch Nachweis der mRNAs von Kollagen Typ I, Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase bestätigt wurde. Im Gegensatz dazu konnten weder mithilfe der Durchflusszytometrie (CD 106) noch RT-PCR (Kollagen

Typ II) Progenitor-Zellen mit chondrogener Vordifferenzierung gefunden werden, was den Erwartungen aus der einschlägigen Literatur entsprach (De Ugarte et al., 2003).

Zur weiteren Bestätigung des multipotenten Charakters der isolierten Zellen wurden Standard-Protokolle eingesetzt (Jaiswal et al., 1997; Johnstone and Yoo, 1999; Pittenger et al., 1999), um das Potenzial zur Differenzierung in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu bestimmen. In diesem Fall wurden histochemische und immun-histochemische Färbungen verwendet. Die Ergebnisse dienten als Qualitätskontrolle der für alle weiteren Untersuchungen dieser Arbeit routinemäßig aus je 2-3 ml Knochenmarkaspirat hergestellten hMSC-Populationen.

4.2. Proliferation

4.2.1 Die Heterogenität der Zellpopulation

Essentielle Voraussetzung für die geplanten Experimente war die Möglichkeit zur *in vitro* Vermehrung der hMSCs. Dabei stand das Problem der Heterogenität der Zellpopulation im Mittelpunkt, was schon von verschiedenen Autoren angesprochen worden ist (Reyes and Verfaillie, 2001; Yoo et al., 2005; Zohar et al., 1997). Da zu Beginn der experimentellen Arbeiten keine allgemein akzeptierte Methode zur Abtrennung der undifferenzierten hMSCs zur Verfügung stand, musste zunächst basierend auf den Erfahrungen anderer Autoren ein zweckmäßiges Verfahren entworfen und etabliert werden.

Bereits die Ergebnisse der Durchfluss-Zytometrie machen deutlich, dass die verschiedenen Zellpräparate eine stark wechselnde Zusammensetzung aufweisen (Smith et al., 2004). Sie stellen stets eine Mischung von mesenchymalen Zellen mit unterschiedlicher Proliferations- und Differenzierungskapazität dar. Es konnte, analog zu Colter et al. (2001), neben einer großen, relativ heterogenen Zellpopulation der hMSCs, deren Eigenschaften nicht näher charakterisiert sind, eine kleine Subpopulation mit der Bezeichnung RS-Zellen gezeigt werden. Der Anteil dieser Zellen bleibt *in vitro* und vermutlich auch *in vivo* stets sehr klein und wird allgemein als Nachschubpotenzial für jeden Bedarf angesehen. Nach Meinung einiger Autoren besitzen nur diese Zellen ein maximales Proliferationspotenzial und sind minimal differenziert (Colter et al., 2000). Andere halten diese RS-Zellen nicht für die einzigen undifferenzierten Zellen in der isolierten Population (Sekiya et al., 2002a; Smith et al., 2004). Teilweise werden sie sogar als eher ungeeignet für die chondrogenese *in vitro* angesehen (Hung et al., 2002). Aus den oben genannten Gründen richtete sich das Interesse im Hinblick auf die geplanten Experimente zur quantitativen Differenzierung gleich auf die größere Fraktion mit heterogener Zusammensetzung. In der Literatur sind bereits verschiedene Verfahren beschrieben worden, mit denen versucht wurde, eine größere Homogenität der Zellpopulation der mesenchymalen Stammzellen zu erreichen (Baksh et al., 2003; Curran

et al., 2005; Mareschi et al., 2001). So wurde von Hung et al. der Einsatz eines Siebes vorgeschlagen, um die hMSCs mit hohem Proliferations- und Differenzierungspotenzial anhand ihrer Größe abzutrennen (Hung et al., 2002). Andere haben versucht, eindeutige Marker für die geeigneten undifferenzierten hMSCs zu finden, um sie mit Hilfe eines Zellsorters auszusortieren (Van Vlasselaer et al., 1994; Waller et al., 1995; Zohar et al., 1997). Zu diesem Zweck wurden mehr als 200 verschiedene Antikörper von Oberflächemolekülen getestet, bisher allerdings ohne eindeutigen Erfolg zu erreichen. Ein anderes Konzept geht von der Idee der selektiven Anreicherung der undifferenzierten hMSCs aus (Prockop et al., 2001). Nach dem Prinzip, dass Proliferationspotenzial und Differenzierungspotenzial invers korreliert sind, sollte das höhere Proliferationspotenzial der undifferenzierten Stammzellen genutzt werden können, um sie durch maximale Proliferation effektiv von bereits vordifferenzierten abzutrennen. Wie Prockop et al. gezeigt haben, könnte dieses Verfahren vorteilhaft zur Anreicherung genutzt werden, wenn die Eigenschaft der Zellen berücksichtigt wird, dass sich undifferenzierte hMSCs bei extrem niedriger Aussaatdichte besonders effektiv vermehren lassen. Wie auch von anderen Autoren bestätigt wird dabei tatsächlich der Anteil der undifferenzierten Zellen angereichert (Sekiya et al., 2002a). Als Erklärung kann angenommen werden, dass parakrine Faktoren, die die unerwünschte Differenzierung stimulieren, so weniger zur Auswirkung kommen. Durch eine niedrigere Aussaatdichte konnte tatsächlich eine wesentlich höhere Proliferationsrate erreicht werden. Wenn damit auch der Anteil der undifferenzierten Zellen erhöht würde, könnte so auch die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, die Zellen später ausschließlich für die chondrogene Differenzierung nutzen zu können. Als Maß für den Erfolg einer chondrogenen Differenzierung konnte die Korrelation von Vermehrungsfaktor als Maß für die Proliferationsrate und die Menge der produzierten Glykosaminoglykane gesehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellpopulationen, die mit stärkerer Proliferationsrate vermehrt wurden, nach chondrogener Differenzierung mehr GAG in der Pellet-Kultur produzieren. Dies wird so interpretiert, dass Zellpopulationen, die als Folge niedriger Aussaatdichte mit stärkerer Proliferationsrate vermehrt wurden, einen höheren Anteil – vermutlich undifferenzierter – Zellen enthalten, die sich später erfolgreich chondrogen differenzieren lassen. Diese Vermutung wird unterstützt durch Analyse der Zellmorphologie mithilfe der Durchfluss-Zytometrie. Mit hohen Proliferationsraten, bei Aussaatdichten von 500 bis 1000 Zellen pro cm^2 vermehrte Zellpopulationen zeigen eine geringere Heterogenität hinsichtlich Größe und Lichtdurchlässigkeit im Vergleich zu solchen, die bei einer Aussaatdichte von 5000 Zellen pro cm^2 vermehrt wurden. Dabei wird nicht so sehr der Anteil der so genannten RS-Zellen erhöht, sondern eher der Anteil der Tochterzellen, die zwar nach der Theorie schon zwar ein niedrigeres Proliferationspotenzial haben, aber immer noch ein ausreichend breites Differenzierungspotenzial entsprechend aufweisen.

Als weitere attraktive Möglichkeit zur Erhöhung der Proliferationsrate wurde neben der Erniedrigung der Aussaatdichte der Einsatz mitogener Wachstumsfaktoren geprüft. Über den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von hMSCs wurde bereits in mehreren Arbeiten berichtet (Chiou et al., 2006; Marcopoulou et al., 2003; Sundberg et al., 2006). Diesen Ergebnissen entsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit besonders der Effekt von bFGF, TGF und PDGF getestet. Als sehr vorteilhaft für die Erhöhung der Proliferationsrate hat sich danach in Übereinstimmung mit Daten anderer Autoren (Bianchi et al., 2003; Chiou et al., 2006; Trippel, 1995) der Einsatz von bFGF erwiesen. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen von GAG/DNA-Analysen wieder. Es ist zwar bekannt, dass einige Wachstumsfaktoren neben der Proliferation auch die Differenzierung der Zellen beeinflussen können (Chiou et al., 2006). Der Effekt lässt sich durch die Vorstellung erklären, dass bFGF im Sinne einer Erhöhung des allgemeinen Differenzierungspotenzials wirkt. Um mögliche Veränderungen des Differenzierungspotenzials der Zellen als Folge des Ergebnisses von bFGF festzustellen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Bei Vermehrung in Gegenwart von bFGF wiesen die Zellen eine verminderte Präsenz von CD 90 und CD 105 als Marker für undifferenzierte hMSCs auf. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, dass bFGF das Differenzierungspotenzial der Zellen vermindert, oder anders ausgedrückt, eine Vordifferenzierung in eine bestimmte Richtung lenkt. Der gleichzeitig beobachtete positive Effekt auf die GAG-Produktion kann bedeuten, dass dabei die chondrogene Differenzierung sehr wahrscheinlich miteingeschlossen ist. Ein chondrogener Effekt von bFGF wurde auch schon bei der *in vitro* Proliferation von adulten Chondrozyten beobachtet (Trippel, 1995). In Hinblick auf die Ziele dieser Arbeit, eine Methode zur Differenzierung von hMSCs zu Chondrozyten zu entwickeln, wurde dieser unterstützende Effekt von bFGF bei der Chance genutzt.

Ein weiterer interessanter Befund wurde genutzt: Bei der Untersuchung der optimalen Adhärenzzeit für die Abtrennung der hämatopoetischen Zellen wurde beobachtet, dass Zellen, die schneller adhären, auch schneller proliferieren. Daher wurde den Zellen im Sinne der Erreichung maximaler Proliferationsraten nur 24 bis 72 Stunden Gelegenheit zur Adhärenz gegeben. Da länger adhären und langsamer proliferierende Zellen auch typische Veränderungen der Morphologie aufwiesen, konnte der visuelle Eindruck im Phasenkontrastmikroskop zur Qualitätskontrolle eingesetzt.

4.2.2 Die Bedeutung einer hohen Proliferationsrate bei der Anreicherung der hMSCs

Die im Laufe von drei Jahren aus Knochenmark-Aspiraten isolierten hMSCs stammten von verschiedenen Spendern und wurden erst nach und nach unter voller

Berücksichtigung der oben aufgeführten Ergebnisse im Sinne der Erreichung einer maximalen Proliferationsrate präpariert. Um noch einmal zu demonstrieren, wie groß der Einfluss der Proliferationsrate auf die chondrogene Differenzierung ist, wurden die Messergebnisse der GAG-Produktion (GAG/DNA-Werte) in der Pellet-Kultur im Rahmen des Drei-Phasen-Modells in Abhängigkeit von der Proliferationsrate mit der die Zellen *in vitro* vermehrt wurden, zusammengestellt. Abbildung 44 zeigt vier verschiedene Korrelationen für vier verschiedene Wachstumsfaktor-Kombinationen. Man erkennt, dass in allen Fällen bei höheren Proliferationsraten, gemessen als Vermehrungsfaktor, auch höhere GAG/DNA-Werte erreicht werden, wobei die Steigungen der Regressionsgeraden durchaus sehr unterschiedlich sind. Das Ergebnis erlaubt zwei Schlussfolgerungen: Einerseits wird die Bedeutung der hohen Proliferationsrate als Grundlage für eine erfolgreiche Differenzierung demonstriert. Andererseits spiegelt es die unterschiedliche Eigenschaft der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Zellpräparationen wieder. Trotz der Vielzahl der Messungen erscheint es daher nicht geeignet, durch Mittelwertbildung von Ergebnissen verschiedener Zellpräparationen mit unterschiedlichen Vermehrungsfaktoren eine höhere statistische Sicherheit für die Aussagen zu gewinnen. Beim Vergleich der mit unterschiedlichen Vermehrungsfaktoren erzielten Ergebnisse müssen diese vielmehr mitberücksichtigt werden. Daher werden die Ergebnisse der qPCR-Analysen auch zusammen mit den anderen Analyse-Daten dargestellt. Auch hier ergibt sich in Übereinstimmung mit der Beurteilung der Grafiken in Abbildung 44 das jeweils beste Ergebnis, wenn Zellen mit hohen Vermehrungsfaktoren verwendet wurden. Experimentell hat sich auch hier die Beurteilung der Morphologie der Zellen während der Proliferation als sehr hilfreich herausgestellt. Die Kolonien weisen bei optimaler Proliferationsrate wachsende und damit für die chondrogene Differenzierung gut geeignete Zellen häufig auf. Als ungeeignet für die chondrogene Differenzierung nach dem Drei-Phasen-Modell haben sich dagegen Präparationen mit einzelnen eiförmigen oder dreieckigen Zellen erwiesen.

4.3 Die Chondrogene Differenzierung von hMSCs

4.3.1 Die Bedeutung von Wachstumsfaktoren

Wie *in vivo* ist der Erfolg der Chondrogenese auch in der Simulation *in vitro* von der Mitwirkung bestimmter Wachstumsfaktoren abhängig (Goldring et al., 2006; Hendriks et al., 2006). *In vitro* haben sich dafür vor allem verschiedene Isoformen von TGF- β sowie IGF-I und Dexamethason bewährt (Im et al., 2006; Sekiya et al., 2002b). IGF-I war der erste Faktor, dessen chondrogene Wirkung beschrieben wurde (Salmon und Daughaday, 1957). Für die Beteiligung dieses anabolen Faktors an der Knorpelbildung bzw. dessen Erhaltung spricht auch sein Vorkommen in der Synovialflüssigkeit (Schalkwijk et al.,

1989). Die unterstützende Wirkung von IGF-I bei der Differenzierung der hMSCs (McQuillan et al., 1986; Neidel et al., 1994) sowie bei der Redifferenzierung von *in vitro* dedifferenzierten Chondrozyten (van Osch et al., 2001) wurde bereits mehrfach beschrieben. Diese und ähnliche Befunde begründen die häufige Verwendung von IGF-I für experimentelle Ansätze zur chondrogenen Differenzierung von hMSCs.

Für TGF- β 3 werden sehr unterschiedliche Funktionen im Rahmen der Chondrogenese beschrieben. Die scheinbar widersprüchlichen Befunde erklären sich dadurch, dass die Wirkung dieses Wachstumsfaktors vom Differenzierungsstatus der Zielzelle abhängig ist (Stalinska and Ferenc, 2005)(Jakob et al.). So wurden sowohl mitogene als auch chondrogene Wirkungen von TGF- β 1 beschrieben (Giannouli and Kletsas, 2006; Yaeger et al., 1997). In Rahmen dieser Arbeit in Kombination mit bFGF und PDGF eingesetzt zeigte TGF- β 1 eine stark mitogene Wirkung. Vergleichbare Wirkung wurde in mehrere Arbeiten gezeigt (Bosse et al., 2006; Im et al., 2006). Demgegenüber wird TGF- β sehr häufig auch eine starke Wirkung bei der Differenzierung zugeschrieben (Wang et al., 2005). Alle drei Isoformen, TGF- β 3 ebenso wie TGF- β 1 und TGF- β 2 werden unter anderem auch von Chondrozyten gebildet. Die regulatorische Rolle von TGF- β bei der Knorpelbildung während der Skelettentwicklung wurde ebenfalls gezeigt (Kawaguchi et al., 2005) Zugleich ist TGF- β offensichtlich an der Aufrechterhaltung der Knorpelfunktionen beteiligt (Ballock et al., 1993; Bohme et al., 1995). So nimmt der GAG-Gehalt in der ECM des Knorpels in Abwesenheit dieses Wachstumsfaktors ab (Cawston et al., 1999; Lee et al., 2004a). Eine synergistische Wirkung von TGF- β 1 mit IGF-I konnte bei Stimulierung der Matrixbildung in adulten humanen Chondrozyten in serumfreiem Medium gezeigt werden (Longobardi et al., 2006; Yaeger et al., 1997). Auch die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von IGF-I und TGF- β 3 wurde in mehreren Publikationen ausführlich untersucht (Im et al., 2006)). Die Bildung und Sezernierung von TGF- β sind von anderen Faktoren wie bFGF oder IGF-I sowie von der TGF- β -Konzentration selbst abhängig (Ruscetti et al., 2005; Wang et al., 2002).

Die Rolle von Glucocorticoiden in den frühen Stadien der Entstehung des Knorpels wird bereits seit mehreren Jahrzehnten untersucht (Jones and Addison, 1975; Kato and Gospodarowicz, 1985). Seitdem wird Dexamethason als einer der wichtigsten Differenzierungsfaktoren für die Chondrogenese und Osteogenese angesehen und experimentell eingesetzt (Kim et al., 2005; Locker et al., 2004; Tanaka et al., 2004). So wurde beobachtet, dass die SOX9 Expression unter Zugabe von z. B. Dexamethason hochreguliert wird, was als Voraussetzung für die Chondrogenese gilt (Sekiya et al., 2000) Dass die Konzentration der Wachstumsfaktoren *in vitro* eine entscheidende Rolle spielen kann, ist ebenfalls gezeigt worden (Richardson et al., 2003; Behrens et al., 1975). Dafür ist der Effekt von Dexamethason ein schönes Beispiel: hohe Konzentration von

Dexamethason bedient die osteogene Differenzierung, während es bei niedrigeren Konzentrationen eine chondrogene Wirkung hat.

4.3.2 Die Pellet-Kultur als Differenzierungsmodell

Eine Reihe von jüngeren Publikationen zum Thema „Chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen“ basiert auf dem Differenzierungsmodell der so genannten Pellet-Kultur (Johnstone et al., 1998). Bei dieser Technik werden die Zellen zunächst zu einem Pellet sedimentiert. Anschließend wird im Laufe einer mehrwöchigen Kultur in Gegenwart eines geeigneten Differenzierungsmediums die Bildung einer extrazellulären Matrix induziert. Die Zusammensetzung sowie die Konzentration der Zusätze könnten sich variieren. Damit wird im Grunde versucht, den Prozess der mesenchymalen Zellkondensierung während der Embryogenese zu simulieren, bei dem spezifische Zell-Zell-Kontakte als Auslöser für die chondrogene Differenzierung verantwortlich gemacht werden (Thorogood und Hinchliffe, 1975; Poole, 1991).

Ein typisches Beispiel für den Einsatz der Pellet-Kultur als Modell zur chondrogenen Differenzierung von hMSCs stellt das 1998 von Mackay beschriebene Verfahren dar (Mackay et al., 1998). In diesem Fall werden TGF- β 3 und Dexamethason eingesetzt, um die sedimentierten hMSCs bei der Matrixbildung zu unterstützen. Wenn der positive Effekt dieser Faktoren auch erwiesen ist, so bleiben die Ergebnisse in qualitativer und quantitativer Hinsicht hinter den Erwartungen zurück (Yang et al., 2004).

Dieser Eindruck wird auch durch die im Rahmen dieser Arbeit zum Vergleich gesammelten Daten über die Verwendung der Pellet-Kultur als Differenzierungsmodell (direkte Pellet-Kultur) bestätigt. In Übereinstimmung mit den Befunden anderer Autoren wird in der direkten Pellet-Kultur kein hyaliner Knorpel, sondern eine biomechanisch minderwertige Matrix gebildet, die durch die überwiegende Synthese von Kollagen des Typs I statt des Typs II sowie eine schwache GAG-Produktion gekennzeichnet ist. Darüber hinaus wird in der direkten Pellet-Kultur von verschiedenen Autoren die Bildung signifikanter Mengen von Kollagen Typ X beobachtet, die auf eine hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten hindeuten scheint (Ichinose et al., 2005). Andererseits wird zu diesem Punkt kritisch bemerkt, dass die frühe Expression von Kollagen Typ X zeitlich vor der des Kollagens Typ II nicht zur Reihenfolge der Aktivierung der Gene passt wie sie von der Chondrogenese *in vivo* her bekannt ist (Winter et al., 2003). Daher kann der Schluss gezogen werden, dass sich die Pellet-Kultur grundsätzlich nicht zur chondrogenen Differenzierung von hMSCs *in vitro* eignet, wenn die Herstellung von hyalinem Knorpel beabsichtigt ist.

Die Ursache für die im Sinne des *Tissue Engineering* unbefriedigenden Ergebnisse kann in der Heterogenität der aus dem Knochenmark isolierten Zellpopulation liegen. Vorstellbar ist, dass die in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vorliegenden Zellen

auf die Zell-Zell-Kontakte und die zugesetzten Wachstumsfaktoren sehr unterschiedlich reagieren. Während unreifere Zellen in die Differenzierung eintreten, beginnen reife Chondrozyten bereits mit der Hypertrophierung. Von TGF- β wurde bereits erwähnt, dass seine Wirkung vom Differenzierungsstatus der Zielzelle abhängt. Als Folge muss eine asynchrone Kultur angenommen werden. Unklar bleibt dabei, wie adipogene oder osteogene Progenitor-Zellen auf diese Behandlung reagieren.

Obwohl die direkte Pellet-Kultur damit weniger als eine Methode zur Knorpelzüchtung aus hMSCs im Rahmen des *Tissue Engineerings* in Frage kommt, muss nicht vollständig auf dieses Verfahren verzichtet werden. Denn wie aus Versuchen zur Aggregation primärer Chondrozyten bekannt ist, lösen Zell-Zell-Kontakte beim reifen Chondrozyten die Bildung einer hyalinen extrazellulären Matrix aus. Damit eignet sich die Pellet-Kultur sehr gut zur Beurteilung des Differenzierungsstatus von Chondrozyten bzw. deren Progenitor-Zellen. Daher wurde zu Beginn dieser Arbeit von der These ausgegangen, dass die Pellet-Kultur nicht mehr als Differenzierungsmodell, sondern nur noch als Testsystem für potenziell differenzierte Zellen eingesetzt werden sollte.

4.3.3 Das Alginat-Gel als Differenzierungsmodell

Als Ersatz für die Pellet-Kultur wurde aufbauend auf der in der Arbeitsgruppe gesammelter Erfahrungen die Einbettung der Zellen in ein Alginat-Gel als Differenzierungsmodell gewählt. Dieses Verfahren erlaubt die Differenzierung der Stammzellen ohne gleichzeitig die Matrix-Synthese zu starten, was als Ursache für die geschilderten Probleme angesehen wurde. Dies wird im Wesentlichen durch Vermeidung von Zell-Zell-Kontakten erreicht. Im Prinzip werden damit die beiden Prozesse Differenzierung und Matrix-Synthese zeitlich voneinander getrennt. Die im Alginat-Gel differenzierten Zellen werden erst anschließend durch intensive Zell-Zell-Kontakte in Pellet- Kultur synchron zur Matrixbildung stimuliert. Aufgrund dieses formal erweiterten Ablaufs wurde für diesen Prozess die Bezeichnung „Drei-Phasen-Modell“ gewählt. Demgegenüber wird die in der Literatur beschriebene direkte Pellet-Kultur, die Differenzierung und Matrix-Synthese gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß zulässt, als „Zwei-Phasen-Modell“ bezeichnet. In beiden Fällen wird die separat durchgeführte Proliferation als erste Phase angesehen. Die Differenzierung der hMSCs in der Alginat-Kultur verhindert effektiv die unerwünschte, vorzeitige Matrix-Synthese und lässt dennoch alle Möglichkeiten der Stimulierung durch Wachstumsfaktoren offen. Darüber hinaus ist im Drei-Phasen-Modell zusätzlich der Vorteil gegeben, die beiden Prozesse durch separate Auswahl der jeweils am besten geeigneten Wachstumsfaktoren optimal zu stimulieren.

Die Bestätigung der Vorteile des Einsatzes des Drei-Phasen-Modells im Vergleich zum Zwei-Phasen-Modell war ein zentraler Punkt dieser Arbeit. Dieses Modell wurde erfolgreich eingesetzt. So wurde in der Pellet-Kultur nach der Differenzierung im Alginat-

Gel nicht nur mehr GAG als in der direkten Pellet-Kultur produziert, sondern auch die Qualität der entstehenden Matrix verbessert. Als weiterer Beweis dafür kann eine wesentlich höhere Syntheserate von Kollagen Typ II angeführt werden. Dies wurde sowohl auf der Protein-Ebene im Western-Blot und immun-histologisch als auch auf der mRNA Ebene mithilfe der qPCR gezeigt.

Die Verwendung der Einbettung von Zellen in ein Alginate-Gel als Kultur zur Knorpelherstellung *in vitro* ist nicht neu (Kavalkovich et al., 2002; Ma et al., 2003; Majumdar et al., 2000; Mehlhorn et al., 2006; Shakibaei and De Souza, 1997). So konnte Majumdar zum Beispiel zeigen, dass im Alginate-Gel gebildete Matrix Kollagen II aufweist (Majumdar et al., 2000). Weitergehend haben mehrere Autoren versucht diese Ergebnisse durch Optimierung der Bedingungen der Alginate-Technik zu verbessern. Dabei wurden unterschiedliche Parameter für die Alginate-Kultur untersucht wie zum Beispiel die Dichte des Gels, die Form des Alginate-Gels, die Zellkonzentration und die Dauer der Kultur (Steinert et al., 2003; Williams et al., 2005). Daneben wurde auch versucht, beide Techniken – die direkte Pellet-Kultur und die Alginate-Kultur - direkt miteinander zu vergleichen. So wurde über Vorteile der Chondrogenese im Alginate-Gel gegenüber der in direkter Pellet-Kultur berichtet (Yang et al., 2004). An diesem Beispiel wird jedoch auch gleichzeitig der wesentliche Unterschied zum eigenen Einsatz der Alginate-Technik deutlich. Er besteht weniger in der Methode als in der Art der Verwendung. Denn während die Einbettung von Zellen in ein Alginate-Gel in den in der Literatur gefundenen erwähnten Beispielen zur Förderung der Chondrogenese einschließlich Differenzierung und Matrixbildung empfohlen wird, wird es im Rahmen des Drei-Phasen-Modells ausschließlich als Differenzierungsmodell eingesetzt. Im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen werden die Zellen im Rahmen des Drei-Phasen-Modells nach der Differenzierung aus dem Alginate-Gel isoliert, um sie anschließend durch Induzierung von Zell-Zell-Kontakten im Pellet zur Matrixbildung anzuregen.

Zur Etablierung dieses Systems im Labor wurde der Einfluss mehrerer Parameter die Differenzierung der Zellen im Alginate-Gel untersucht, darunter vor allem verschiedene Wachstumsfaktoren, der Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase, die Zelldichte im Gel sowie auch der Dauer der Alginate-Kultur.

Der positive Effekt eines erniedrigten Sauerstoffpartialdrucks für die Differenzierung bzw. Redifferenzierung von Chondrozyten wurde bereits beschrieben (Domm et al., 2002). Dies entspricht auch der Kenntnis über die natürliche Umgebung der Chondrozyten. Wie von Brighton berichtet wurde, kann der Sauerstoffgehalt im nativen Knorpel bis auf ca. 1% sinken (Brighton and Heppenstall, 1971). Damit erscheinen die in dieser Arbeit dargestellte Befunde über eine unterstützende Rolle eines auf 10% erniedrigten Sauerstoffpartialdrucks in der chondrogenen Differenzierung in der Alginate-Kultur durchaus plausibel. Es ist bekannt, dass stoffwechsel-aktive Zellen, sei es während der

Proliferation oder Matrix-Synthese, einen höheren Sauerstoffverbrauch haben. Dementsprechend können diese Prozesse auch durch eine maximale Versorgung mit Sauerstoff gefördert werden. Anders ist es mit wenig Energie verbrauchenden Prozessen wie der Differenzierung. Hier ist ein niedrigerer Sauerstoffpartialdruck von Vorteil (Wang et al., 2000). Ganz analoge Überlegungen führten auch zur Entscheidung, in der Alginate-Kultur ein Medium mit niedrigerer Glucosekonzentration zu wählen und in der Pellet-Kultur ein solches mit höherer Glucosekonzentration zu verwenden. Dass diese Entscheidung Vorteile brachte, konnte durch eine gesteigerte GAG-Produktion experimentell bestätigt werden (Daten im Anhang).

Die optimale Zelldichte für die Differenzierungsphase in der Alginate-Kultur wurde rein experimentell ermittelt. Als Kriterien dafür dienten die GAG-Bildungsrate und der DNA-Gehalt als Maß für die Vitalität der Zellen in der folgenden Pellet-Kultur. Die von anderen Autoren empfohlene höhere Zelldichte, die angeblich für die Matrixbildung im Alginate-Gel förderlich ist (Majumdar et al., 2000), wirkt im Alginate-Gel als eine Differenzierungsphase eher schädlich. Bei einer suboptimalen Zelldichte wird ein überproportionaler Abfall der GAG-Syntheserate beobachtet, was auf die Unterstützung der Differenzierung durch parakrine Faktoren hinweist¹. Als vorteilhaft hat sich die Zelldichte von 2 Mio. Zellen pro ml Alginate-Kultur herausgestellt. Dieser Wert entspricht ungefähr der Zelldichte im nativen Knorpel (ca. 1,6 Mio pro ml Matrix).

Ein weiteres Kriterium bei der Optimierung der Differenzierung in der Alginate-Kultur war die Dauer der Alginate-Kultur. Die experimentellen Daten zeigen, dass ein Zeitraum von zwei Wochen als minimal anzusehen ist, um den Zellen optimal Gelegenheit zum Erreichen des Differenzierungsstatus des reifen Chondrozyten zu geben. Gemessen wurde das in Form der Matrixbildung in einer anschließenden Standard-Pellet-Kultur. Eine längere Alginate-Kultur hat Nachteile durch Zellverluste. Nach drei Wochen Kultur im Alginate-Gel sinkt die Zellzahl, was durch DNA-Analyse in der Pellet-Kultur festgestellt wurde.

Da die Optimierung der Methode auch unter der Perspektive eines späteren therapeutischen Einsatzes durchgeführt wurde, wurde auch die Verwendung von humanem Serum (als Ersatz für autologes Serum) in der Differenzierungsphase im Alginate-Gel getestet. Die Ergebnisse erbrachten im Vergleich zum Kälberserum keine sichtbaren Unterschiede (Daten im Anhang).

Eines der wichtigsten Kriterien für den Erfolg der Alginate-Kultur als Differenzierungsmodell sollte die Charakterisierung der aus dem Alginate-Gel isolierten Zellen mit den

¹ Da für die Pellet-Kulturen immer dieselbe Anzahl der Alginatebeads eingesetzt wurde und die Standardbedingungen in der Pellet – Kultur gleich waren (s. M&M), kann man mit Sicherheit sagen, dass die einzige Ursache für die Abnahme der Anzahl der Zellen die Zelldichte im Alginate bzw. die Dauer der Alginate – Kultur war.

Eigenschaften von reifen Chondrozyten sein. Zu diesem Zweck wurde die Fähigkeit zur Bildung von Chondronen, eine einzigartige, für Chondrozyten typische Struktur herangezogen (Poole et al., 1992). Der Nachweis der Bildung der Chondrone erfolgte einerseits durch die typische Morphologie und andererseits durch die immunologische Identifizierung eines für die Chondrone hochspezifischen Markers, des Kollagen Typ VI. Darüber hinaus ergab die quantitative Auswertung, dass praktisch alle aus dem Alginat-Gel isolierten Zellen (98%+- 2%) mit dem fluoreszenzmarkierten, gegen Kollagen Typ VI gerichteten Antikörper angefärbt wurden. Das bedeutet, dass es mit dem Drei-Phasen-Modell gelungen ist, eine praktisch homogene Zellpopulation von reifen Chondrozyten aus einer hinsichtlich des Differenzierungsstatus heterogenen Population von hMSCs zu gewinnen. Die Bildung von Kollagen Typ VI wurde von der Bildung von Kollagen Typ II und I begleitet. Die Synthese von Kollagen Typ II ist charakteristisch für hyalinen Knorpel und ist notwendig für einen sinnvollen Gewebeersatz (Poole et al., 1992). Die gleichzeitige Bildung von Kollagen Typ I kann als Hinweis auf die Scarring-Reaktion interpretiert werden. Sie wird *in vitro* bei suboptimalen Kulturbedingungen beobachtet (Shakibaei et al., 1993).

In Rahmen der Suche nach den optimalen Bedingungen für die Differenzierung im Alginat-Gel wurden auch unterschiedliche Kombinationen von Wachstumsfaktoren getestet. Als Startbedingung wurde dieselbe Kombination in denselben Konzentrationen wie für die direkte Pellet-Kultur als essentiell beschrieben verwendet, nämlich Dexamethason, TGF- β 3 und IGFI. Um den Beitrag der einzelnen Wachstumsfaktoren einzugrenzen, wurden sie einzeln und in Kombinationen aus dem Kulturmedium weggelassen.

Das Weglassen von Dexamethason führte zu Abnahme des Anteil der Zellen, die sich nach Differenzierung in der Alginat-Kultur mithilfe von Antikörpern gegen Kollagen Typ I, II und VI anfärben ließen. Zusätzlich wurde auf mRNA- Ebene vor allem eine Abnahme der Kollagen Typ II- Expression beobachtet, wobei die Expression von Kollagen Typ I praktisch unverändert blieb. Der aus diesen Ergebnissen abzuleitende positive Einfluss von Dexamethason auf die Differenzierung der Stammzellen steht damit im Übereinstimmung mit Daten, die schon von anderen Autoren gezeigt wurden (Derfoul et al., 2006; Grigoriadis et al., 1989). Ebenfalls als Folge des Weglassens von Dexamethason wurde ein leichter Abfall der Expression von SOX9 und Kollagen Typ X festgestellt. Dies steht in der Gleichheit mit Beobachtungen von Johnstone und Chen, die den Einfluss von Dexamethason und TGF- β 3 im Differenzierungsmodell der Pellet-Kultur untersucht haben (Johnstone et al., 1998; Chen CW et al., 2005).

Als wichtigstes Kriterium zur Beurteilung des Effektes von Dexamethason auf die Differenzierung im Alginat-Gel wurde jedoch das Matrixbildungspotenzial der Zellen in einer anschließenden Pellet-Kultur angesehen. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen

weniger GAG produzierten, wenn sie in Abwesenheit von Dexamethason differenziert worden waren. Offensichtlich wurde Dexamethason von den Zellen in der Alginat-Kultur benötigt um den Differenzierungsstatus des Chondrozyten zu erreichen. Auch diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von anderen Autoren, die über eine essentielle Rolle von Dexamethason bei der Redifferenzierung dedifferenzierter Chondrozyten sowie der chondrogenen Differenzierung von Stammzellen berichten (Ochi et al., 2006).

Ein positiver Effekt von TGF- β 3 auf die Differenzierung von hMSCs zu Chondrozyten ist bereits bekannt (Lee et al., 2004b; Zhang et al., 2006). Diese Rolle von TGF- β 3 konnte auch durch Untersuchungen zu dieser Arbeit bestätigt werden. So führte die Anwesenheit von TGF- β 3 zu einer starken Induktion von Kollagen Typ II-mRNA neben einem schwächeren Effekt auf die Kollagen Typ I-mRNA. Zusätzlich wurde eine leichte Induktion der Expressionen von Sox9 und Kollagen X beobachtet. Diese Effekte stimmen mit publizierten Daten überein (Im et al., 2006).

Auf der Proteinebene (Chondronbildung), verursachte das Weglassen von TGF- β 3 starke Verluste bei der Kollagen Typ I-Synthese, eine geringe Zunahme der Kollagen Typ II-Synthese und keine sichtbaren Änderungen beim Kollagen Typ VI. Auf die GAG-Synthese in der Pellet-Kultur hat das Weglassen von TGF- β 3 während der Differenzierungsphase einen positiven Effekt. Bei Abwesenheit von TGF in der Alginat-Kultur wird kaum mehr GAG gebildet. Das bestätigt die essentielle Rolle von TGF- β 3 für die chondrogene Differenzierung. Dieser Effekt wurde schon von anderen Autoren beobachtet (Indrawattana et al., 2004).

Die wichtige Rolle von IGF-I in der Chondrogenese ist bereits seit langem bekannt (Blunk et al., 2002; Yaeger et al., 1997). Das begründet den häufigen Einsatz dieses Faktors in der Differenzierungsphase. IGF -I hat auch in der Alginat-Kultur eine positive Wirkung, die sich als erhöhte GAG-Bildungsrate in der Pellet-Kultur äußert. Auf mRNA-Ebene wirkt sich die Anwesenheit von IGF-I während der Differenzierungsphase stark positiv auf die Induktion von Kollagen Typ II und in etwas schwächerem Maße auf die Induktion von Kollagen Typ I und Sox9 aus. Die Expression von Kollagen Typ X blieb unter diesen Bedingungen unverändert. Auch die Bildung der Chondrone im Alginat-Gel wird von IGF-I gefördert. Das Weglassen von IGF-I in der Alginat-Kultur führt zu einer deutlichen Verringerung der Matrixsynthese.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TGF- β 3, IGF- 1 und Dexamethason auch unter den Bedingungen der Alginat-Kultur als essentielle Faktoren für die chondrogene Differenzierung von hMSCs eingestuft werden können. Die positiven Wirkungen dieser Faktoren auf die Differenzierung der Zellen in der Alginat-Kultur konnten sowohl auf der Ebene der mRNA mit Hilfe der RT-PCR, auf der Protein-Ebene durch immunologische Analysen von Cytospins sowie auch funktionell in Form der GAG-Produktion in der

anschließenden Pellet-Kultur nachgewiesen werden. Die ebenfalls beobachtete Induktion der Kollagen I Synthese vor allem unter dem Einfluss von TGF- β 3 und IGF-I in der Alginat-Kultur scheint zunächst dem Ziel der chondrogenen Differenzierung zu widersprechen. Dieses Ergebnis sollte jedoch nicht überbewertet werden. Es hat sich herausgestellt, dass der Differenzierungsstatus der aus dem Alginat-Gel isolierten Zellen nicht reproduzierbar durch Analyse der mRNA-Level von Kollagen Typ I und II beurteilt werden konnte. Das wurde aus experimentellen Gründen nicht weiter untersucht. Demgegenüber hat sich als einzig verlässliche Methode die funktionelle Überprüfung der putativen Chondrozyten in der anschließenden Pellet-Kultur bewährt.

4.3.4 Die Matrixbildung in der Pellet-Kultur

In Ergänzung zu den Hinweisen auf eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen in der Alginat-Kultur des Drei-Phasen-Modells wurden zusätzliche Untersuchungen mit dem Ziel der funktionellen Überprüfung der aus dem Alginat-Gel isolierbaren differenzierten Chondrozyten vorgenommen. Dazu wurde die Pellet-Kultur als Modell für die Matrixbildung des hyalinen Knorpels eingesetzt. Die Ergebnisse der Pellet – Kulturen zeigen die Überlegenheit des Drei-Phase-Modells im Vergleich zum Zwei-Phasen-Modell. Die GAG-Syntheserate ist signifikant erhöht, wenn eine zusätzliche Differenzierungsphase eingeschaltet wurde. Das Ergebnis demonstriert den Vorteil der quantitativen Differenzierung der eingesetzten Zellen. Immun-histologische Analysen bestätigen den Befund.

Der Unterschied fällt deutlicher auf, wenn der Effekt der zusätzlichen Differenzierung im Drei-Phasen-Modell auf die Genexpression einiger Chondrogenese-Marker untersucht wird. Hier wird in zwei Beispielen gegenüber dem Zwei-Phasen-Modell ein 30-70-fach erhöhter Spiegel von Kollagen II-mRNA gefunden. Von ebenso großer Relevanz ist, dass die mRNA-Konzentrationen von Kollagen Typ I und X hier gleichzeitig um weniger als den Faktor 2 ansteigen.

Zu Ausschöpfung der Vorteile, die das Drei-Phasen-Modell bietet, wurde ebenfalls versucht, die Kulturbedingungen für die Pellet-Kultur separat zu optimieren. Da bereits aus der Literatur bekannt war, dass die Bildung der extrazellulären Matrix bei hyalinem Knorpel nicht nur nicht durch die Anwesenheit von Dexamethason und TGF- β 3 unterstützt, sondern gehemmt wird (Chadjichristos et al., 2002; De Luca, 2006; Gerwin et al., 2006), wurden die Effekte der Weglassung dieser Faktoren ebenfalls untersucht. So wurde ein hemmender Effekt auf die GAG-Bildung durch TGF- β 3 und DEX auch in der Pellet-Kultur des Drei-Phasen-Modells nachgewiesen werden. Hier wird ein bedeutsamer Gegensatz zum Zwei-Phasen-Modell deutlich, in dem diese beiden Faktoren als essentiell angesehen werden (Mackay et al., 1998).

Allerdings scheinen die Effekte von Dexamethason und TGF- β 3 hinsichtlich der GAG-Synthese nicht additiv zu sein und auf IGF-I sollte auch nicht verzichtet werden. Ähnliche Befunde ergeben sich beim Vergleich der immun-histologischen Daten: In den Paraffinschnitten von Pellet-Kulturen nach zusätzlicher Differenzierung erkennt man eine deutlich stärkere Anfärbung durch Kollagen II-Antikörper, wenn Dexamethason und/oder TGF- β 3 weggelassen werden. In Gegenwart von IGF-I und in Abwesenheit von Dexamethason und TGF steigt nicht nur die Kollagen II-Synthese, sondern auch die Bildung des Kollagens Typ I. Das deutet auf einen komplexen Einfluss von IGF-I hin. Einerseits ist die Zugabe von IGF-I für die GAG-Bildung erforderlich, andererseits wird dadurch in Abwesenheit von TGF- β 3 und Dexamethason die Kollagen Typ I-Synthese stimuliert.

Auch das Weglassen von allen drei Faktoren ist nicht annehmbar, denn neben einer starken erwünschten Anfärbung von Kollagen Typ II wird auch Kollagen Typ I begünstigt, nicht aber die GAG-Bildung. Möglicherweise kann eine Optimierung nur durch genauere Dosierung der Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren ermittelt werden. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde die wichtige Rolle von IGF-I für Proteoglykansynthese auch von anderen Autoren gezeigt (McQuillan et al., 1986, Neidel et al., 1994).

Die beobachtete negative Wirkung von TGF- β 3 und Dexamethason auf die GAG-Produktion und immunologisch gemessene Kollagen-Synthese wird durch qPCR-Messungen ergänzt. Es wird eine starke Induktion der Kollagen II-Expression beobachtet, wenn entweder Dexamethason oder TGF- β 3 weggelassen wurde. Gleichzeitig wurde die mRNA-Menge von Kollagen I und SOX9 kaum beeinflusst. Unter diesen Bedingungen wird zwar zum Teil auch ein relativer Anstieg der Expression von Kollagen Typ X festgestellt, jedoch auf einem wesentlich niedrigeren Niveau. Möglicherweise ist die erhöhte mRNA Konzentration von Kollagen Typ X biologisch unschädlich für die Bildung von hyalinem Knorpel, weil sie in der Größenordnung des im nativen Knorpel gefundenen Wertes liegt. Im Gegensatz zu diesen Befunden wirkt sich eine gleichzeitige Weglassung von TGF- β 3 und Dexamethason ungünstig aus. Zwar wird auch in diesem Fall eine Induktion der Kollagen II-mRNA gemessen, doch wird gleichzeitig auch die Expression von Kollagen Typ I und X stimuliert. Dieses Ergebnis ist nicht zufrieden stellend, da es dem Bild der Arthrose nahe kommt (Gebhard et al., 2003; Ho et al., 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die im Drei-Phasen-Modell gebotene Chance zur individuellen Stimulierung der Differenzierung und Matrixbildung erfolgreich genutzt werden kann. Insbesondere wird jedoch in einer genaueren Dosierung der einzelnen, eingesetzten Wachstumsfaktoren noch eine Möglichkeit gesehen, gezielt die Synthese der Matrixkomponenten im Sinne der Bildung des hyalinen Knorpels weiter zu optimieren.

Vergleich der mit dem Drei-Phasen-Modell gewonnenen Knorpelproben mit nativem, humanem Knorpel aus der Gelenkfläche des Knies

Da die vorliegende Arbeit zur Klärung der Frage beitragen sollte, in wie weit sich aus dem Knochenmark isolierbare Stammzellen zum *Tissue Engineering* von hyalinen Knorpel-Implantaten eignen, ist ein Vergleich der mit dem Drei-Phasen-Modell herstellbaren Knorpelproben mit dem Original von großem Interesse. Dazu wurden zwei Methoden herangezogen, die Analyse der Genexpression wichtiger Genmarker mit Hilfe der qPCR sowie immun-histologische Anfärbungen von Paraffinschnitten. Ein direkter Vergleich der Genexpression der in dieser Arbeit verwendeten Genmarker zeigt, dass in der Pellet-Kultur nach dem Drei-Phasen-Modell unter den zur Zeit optimalen Bedingungen, das heißt in Abwesenheit von TGF- β 3 oder Dexamethason eine sehr starke Induktion der mRNA von Kollagen Typ II festgestellt wurde. Was im Hinblick auf das angestrebte Ziel ebenso relevant ist, gleichzeitig blieben die Spiegel für die mRNAs von Kollagen Typ I und Typ X in der Größenordnung der im nativen Knorpel gefundenen Werte. Auch für Sox9 wurde keine sichtbare Änderung beobachtet. Die Grafik in Abbildung 45 demonstriert zusätzlich die Empfindlichkeit des Systems. Werden beide Faktoren - TGF- β 3 und Dexamethason – gleichzeitig weggelassen, hat dies schlechte Auswirkungen. Jetzt werden die Gene von Kollagen Typ I und X stärker aktiviert als die des Kollagens Typ II. Das Ergebnis des immun-histologischen Vergleichs zeigt, dass unter den bisher besten ermittelten Bedingungen wie in der nativen Probe eine starke Anfärbung mit gegen Kollagen Typ II gerichteten Antikörpern, nicht aber mit solchen gegen Kollagen Typ I erzielt wurde. Zusätzlich wird die präferentiell perizellulär lokalisierte Anfärbung mit Kollagen Typ VI-Antikörpern deutlich. Insgesamt erscheinen die interzellulären Abstände in der nativen Probe zwar noch größer als in der *in vitro* hergestellten. Doch ist dies erfahrungsgemäß keine Behinderung für den Einsatz beim *Tissue Engineering*.

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Verfahrens zur chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Dazu wurde ein so genanntes Drei-Phasen-Modell entworfen, das die zeitliche Trennung und separate Stimulierung der drei wesentlichen Prozesse - Proliferation, Differenzierung und Matrix-Synthese ermöglicht. Zur Gewinnung einer für dieses Vorhaben geeigneten Zellpopulation aus dem Knochenmark wurde ein Verfahren zur Anreicherung schnell proliferierender und damit nur in geringem Maße differenzierter Progenitorzellen entwickelt. Zur Überwachung der Zellqualität wurden verschiedene Methoden der Durchfluss-Zytometrie eingesetzt. Die Differenzierung der Zellen erfolgte nach reversibler Einbettung in ein Gel, um durch Vermeidung von Zell-Zell-Kontakten eine vorzeitige Initiierung der Matrixbildung zu verhindern. Die Unterstützung des Differenzierungsprozesses durch Wachstumsfaktoren wie IGF-I, TGF- β 3 und Dexamethason wurde durch Messung der Matrixbildung und der Genexpression von Kollagen Typ I, II und X verifiziert. Der Nachweis des Erfolges der quantitativen Differenzierung gelang durch immunhistologische Anfärbung des Kollagens Typ VI, eines hochspezifischen Markers für Chondrone. Zur funktionellen Verifizierung der Differenzierung der hMSCs zu reifen Chondrozyten wurde die von den Zellen in einer dreiwöchigen Pellet-Kultur gebildete Matrix hinsichtlich der gebildeten Glykosaminoglykane und der Expression einiger für hyalinen Knorpel charakteristischen Gene analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass nach Optimierung der Bedingungen, unter anderem der Weglassung von TGF- β 3 oder Dexamethason aus dem Kulturmedium, ein für den hyalinen Knorpel typisches Expressionsmuster erreicht werden konnte. Während die Bildung von mRNA des Kollagens Typ II stark stimuliert werden konnte, blieb die von Kollagen Typ I und X auf niedrigem Niveau. Die Ergebnisse konnten durch immunhistologische Analysen von Paraffinschnitten bestätigt werden. Auch hier konnten Bedingungen ermittelt werden, unter denen Kollagen Typ II und VI vermehrt gebildet wurden, während Kollagen Typ I unterhalb der Nachweisgrenze blieb. Gemessen an diesen Parametern übertrifft die Qualität des mit dem Drei-Phasen-Modell hergestellten Knorpels bei weitem diejenige, die von anderen Autoren bisher mit dem Differenzierungsmodell der Pellet-Kultur erreicht werden konnte. Die vergleichende Analyse der Genexpression wichtiger Genmarker des Knorpels sowie immunhistologische Vergleiche der in vitro hergestellten Knorpelprobe mit nativem Knorpel führen zu dem Schluss, dass das entwickelte Drei-Phasen-Modell eine sehr gute Chance für den Einsatz von hMSCs aus dem Knochenmark zur Herstellung von Knorpel-Implantaten für die Therapie von Gelenkflächenschäden darstellt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. Nr.	Titel	Seite
Abb 1	Eine schematische Darstellung des senkrechten Längsschnittes des Gelenkknorpels	5
Abb 2	Die Struktur des Chondrons. Die schematische Darstellung	6
Abb 3	Molekularer Aufbau des Knorpels	7
Abb 4	Vereinfachte Darstellung einzelner Schritte der Chondrogenese mit den wichtigsten Markerproteinen	8
Abb 5	Ein Modell der Entwicklung der adulten MSC	12
Abb 6	Zwei- Phasen und Drei- Phasen Modell zur chondrogenen Differenzierung der hMSC	17
Abb 7	Schematische Darstellung der Ficoll-Gradienten-Auftrennung	22
Abb 8	Schematische Darstellung der Zellkultur der hMSC.	24
Abb 9	Schematische Darstellung der Alginate-Kultur der hMSC.	27
Abb 10	DNA-Eichkurve - Vergleich der Regression der erwarteten mit den gemessenen Werten	47
Abb 11	Schematische Darstellung des Ablaufs der Versuche	48
Abb 12	Die Auftrennung der Zellsuspension im Ficoll-Gradienten	49
Abb 13	Erfolgreiche Entfernung CD45-positiver Zellen nach der Auftrennung im Ficoll – Gradienten und Adhäsion	50
Abb 14	Unterschiedliche Morphologie der Zellen direkt nach der Ficoll-Gradienten-Auftrennung im Vergleich zu den Zellen, die an der Oberfläche der Kulturflaschen adhärirten.	51
Abb 15	Verschiedene Oberflächen-Antigene zur Charakterisierung der Heterogenität der MNC direkt nach der Auftrennung im Ficoll-Gradienten.	52
Abb 16	PCR-Analyse einiger Differenzierungsmarker direkt nach der Isolierung	53
Abb 17	Tripotenz der Zellen nach Passage 1	54
Abb 18	Auswirkungen der Aussaatdichte auf die Proliferationsrate der Zellen	56
Abb 19	Abhängigkeit der Morphologie der Zellen von ihrer Aussaatdichte	57
Abb 20	Aussaatdichte und Passagenzahl beeinflussen die Morphologie der Zellen	57
Abb 21	Einfluss mitogener Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der Zellen	59
Abb 22	Einfluss der Zugabe von FGF auf die Präsenz der Differenzierungsmarker CD 90 und CD 105 während der Proliferation der Zellen	60
Abb 23	Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf die GAG-Synthese in Pellet-Kulturen nach Stimulierung der Proliferation	61
Abb 24	Vergleich des GAG/DNA-Quotienten nach direkter Pellet-Kultur und Pellet-Kultur nach Alginate-Differenzierung in Abhängigkeit von Passagenzahl und Proliferationsrate.	63
Abb 25	Die Wirkung der Dauer der Alginate-Kultur auf die Matrixbildung in der Pellet-Kultur nach Differenzierung in Alginate	64
Abb 26	Abhängigkeit der Effektivität der Differenzierung im Alginate-Gel von der initial eingesetzten Zelldichte	65
Abb 27	Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks in der Alginate-Kultur auf die GAG-Synthese in der anschließenden Pellet-Kultur	66

Abb 28	Direkter Nachweis der GAG-Bildung in der Alginate-Kultur	67
Abb 29	Direkter Nachweis der Kollagen-Bildung in der Alginate-Kultur	68
Abb 30	Der Vergleich der Struktur von nativen Chondronen und Pseudo-Chondronen aus dem Alginate-Gel.	69
Abb 31	Quantitative Auswertung der im Alginate-Gel gebildeten Pseudochondrone	70
Abb 32	Auswirkung der Zugabe von Dexamethason auf die Differenzierung der Zellen in Alginate-Kultur	71
Abb 33	Auswirkung der Zugabe von TGF- β 3 auf die Differenzierung der Zellen in Alginate-Kultur	72
Abb 34	Wirkung von IGF- I auf die Differenzierung der Zellen in der Alginate- Kultur	73
Abb 35	GAG/DNA Analyse der Matrixbildung in Pellet-Kultur mit und ohne Alginate-Phase	75
Abb 36	Kollagenbildung in Pelletkultur mit und ohne Alginate-Phase	75
Abb 37	Immunhistologie des in Pellet-Kulturen gebildeten Knorpel-Gewebes ohne und mit zusätzlicher Differenzierung in Alginate-Pelletkultur	76
Abb 38	Genexpression einiger Targetgene in Pelletkultur mit und ohne zusätzlicher Differenzierung in der Alginate-Kultur.	77
Abb 39	Effekt des Weglassens von Dexamethason, TGF- β 3 und IGF-I aus dem Kulturmedium der Pellet-Kultur auf die GAG-Bildung	79
Abb 40	Die Auswirkungen von DEX, TGF- β 3 und IGF-I auf die Biosynthese von Kollagen Typ I und II in der Pellet-Kultur nach der Differenzierung in der Alginate-Kultur	80
Abb 41	Einfluss des Weglassens verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Genexpression wichtiger Knorpelmarker während der Matrixbildung in der Pellet-Kultur	81
Abb 42	Einfluss von TGF- β 3, Dexamethason und IGF-I auf die Genexpression wichtiger Knorpelmarker	82
Abb 43	Der Zusammenhang zwischen Zellmorphologie einerseits und Adhärenzzeit und Proliferationsrate der Zellen andererseits	84
Abb 44	Der Zusammenhang der GAG-Bildung in der Pellet-Kultur und der in der Proliferationsphase erreichten Vermehrungsfaktoren	85
Abb 45	Vergleich der in Pellet-Kulturen nach dem Drei-Phasen-Modell erzielten Genexpression wichtiger Knorpelmarker mit der im nativen, humanen Knorpel	86
Abb 46	Vergleich immunologisch angefärbter histologischer Schnitte aus Pellet-Kulturen nach dem Drei-Phasen-Modell mit den Schnitten vom nativen, humanen Knorpel	87
Tab. 1	Primer für PCR	33
Tab. 2	Primer für qPCR	34
Tab. 3	Antikörper	36-37
Tab. 4	Die Zellzahl und Anzahl der genommenen Proben für die DNA-Eichkurve	46

Literaturverzeichnis

- Adkisson HD, Gillis MP, Davis EC, Maloney W and Hruska KA (2001) In vitro generation of scaffold independent neocartilage. *Clin Orthop Relat Res*:S280-94.
- Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V and Johnstone B (1999) Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge. *Tissue Eng* **5**:545-54.
- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A and Owen M (1980) Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*:294-307.
- Baksh D, Song L and Tuan RS (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* **8**:301-16.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA and Clark BJ (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* **21**:389-95.
- Barry F, Boynton R, Murphy M, Haynesworth S and Zaia J (2001a) The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **289**:519-24.
- Barry F, Boynton RE, Liu B and Murphy JM (2001b) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* **268**:189-200.
- Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM and Zaia J (1999) The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* **265**:134-9.
- Behrens F, Shepard N, Mitchell N. Alterations of rabbit articular cartilage by intra-articular injections of glucocorticoids. *J Bone Joint Surg (Am)* 1975; 57 (1): 70-6.
- Bennett VD and Adams SL (1987) Characterization of the translational control mechanism preventing synthesis of alpha 2(I) collagen in chicken vertebral chondroblasts. *J Biol Chem* **262**:14806-14.
- Benya PD and Shaffer JD (1982) Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* **30**:215-24.
- Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R and Quarto R (2003) Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* **287**:98-105.
- Bianco P and Gehron Robey P (2000) Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* **105**:1663-8.
- Binette F, McQuaid DP, Haudenschild DR, Yaeger PC, McPherson JM and Tubo R (1998) Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* **16**:207-16.
- Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C and Freisinger P (1994) Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* **212**:97-104.
- Bridgewater LC, Lefebvre V and de Crombrughe B (1998) Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem* **273**:14998-5006.

- Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L (1996) Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 326:270–283
- Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T and Lindahl A (2003) Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**:109-15.
- Buckwalter JA and Mankin HJ (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* **47**:477-86.
- Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B and Quarto R (2000) Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol* **44**:707-14.
- Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**:641-50.
- Caplan AI (1994) The mesengenic process. *Clin Plast Surg* **21**:429-35.
- Carney SL and Muir H (1988) The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Rev* **68**:858-910.
- Chacko S, Abbott J, Holtzer S and Holtzer H (1969) The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behavior of the progeny of a single chondrocyte. *J Exp Med* **130**:417-42.
- Chubinskaya S, Huch K, Schulze M, Otten L, Aydelotte MB and Cole AA (2001) Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *J Histochem Cytochem* **49**:1211-20.
- Clark JM (1991) Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit, and man. *J Orthop Res* **9**:246-57.
- Colter DC, Sekiya I and Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7841-5.
- Conget PA and Minguell JJ (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* **181**:67-73.
- Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M and Wobus AM (2003) Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem* **384**:1391-409.
- De Ceuninck F, Caliez A, Dassencourt L, Anract P and Renard P (2004) Pharmacological disruption of insulin-like growth factor 1 binding to IGF-binding proteins restores anabolic responses in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther* **6**:R393-403.
- De Luca F (2006) Impaired growth plate chondrogenesis in children with chronic illnesses. *Pediatr Res* **59**:625-9.
- Diab M, Wu JJ and Eyre DR (1996) Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem J* **314 (Pt 1)**:327-32.
- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R and Prockop DJ (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* **107**:275-81.
- Eckstein F, Reiser M, Englmeier KH and Putz R (2001) In vivo morphometry and functional analysis of human articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging--from image to data, from data to theory. *Anat Embryol (Berl)* **203**:147-73.
- Eyre DR, Wu JJ and Apone S (1987) A growing family of collagens in articular cartilage: identification of 5 genetically distinct types. *J Rheumatol* **14 Spec No**:25-7.

- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G and Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**:1528-30.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F. Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* **4**, 267-274.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI and Frolova GP (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**:230-47.
- Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J, Dresing K and Sturmer KM (2002) Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. *Cells Tissues Organs* **170**:214-27.
- Fujita T, Fukuyama R, Enomoto H and Komori T (2004) Dexamethasone inhibits insulin-induced chondrogenesis of ATDC5 cells by preventing PI3K-Akt signaling and DNA binding of Runx2. *J Cell Biochem* **93**:374-83.
- Fukuda K and Fujita J (2005) Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* **68**:1940-3.
- Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Naim R, Schafer C, Sadick H, Hormann K and Riedel F (2005) Human chondrocytes differentially express matrix modulators during in vitro expansion for tissue engineering. *Int J Mol Med* **16**:509-15.
- Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Baisch A, Hormann K and Riedel F (2006) In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes. *Otolaryngol Head Neck Surg* **134**:510-5.
- Gojo S and Umezawa A (2003) Plasticity of mesenchymal stem cells--regenerative medicine for diseased hearts. *Hum Cell* **16**:23-30.
- Goldring MB, Tsuchimochi K and Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **97**:33-44.
- Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J and Schwartz RE (1999) Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop Relat Res*:S176-85.
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesisidis A and Simmons PJ (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* **116**:1827-35.
- Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB and Watzek G (2004) Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets* **15**:29-35.
- Grundmann K, Zimmermann B, Barrach HJ and Merker HJ (1980) Behaviour of epiphyseal mouse chondrocyte populations in monolayer culture. Morphological and immunohistochemical studies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **389**:167-87.
- Hall BK and Miyake T (2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* **22**:138-47.
- Hangody L and Fules P (2003) Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 2**:25-32.
- Hangody L, Kish G, Modis L, Szerb I, Gaspar L, Dioszegi Z and Kendik Z (2001) Mosaicplasty for the treatment of osteochondritis dissecans of the talus: two to seven year results in 36 patients. *Foot Ankle Int* **22**:552-8.

- Hangody L, Kish G, Karpati Z et al. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* 1998; 21: 751–756
- Hardingham TE, Bayliss MT, Rayan V and Noble DP (1992) Effects of growth factors and cytokines on proteoglycan turnover in articular cartilage. *Br J Rheumatol* **31 Suppl 1**:1-6.
- Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE, Gitelis SH and Thonar EJ (1992) Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix* **12**:116-29.
- Healy C, Uwanogho D and Sharpe PT (1999) Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn* **215**:69-78.
- Heyland J, Wiegandt K, Goepfert C, Nagel-Heyer S, Ilinich E, Schumacher U and Portner R (2006) Redifferentiation of chondrocytes and cartilage formation under intermittent hydrostatic pressure. *Biotechnol Lett*.
- Huang CY, Reuben PM, D'Ippolito G, Schiller PC and Cheung HS (2004) Chondrogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in agarose culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **278**:428-36.
- Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL and Lo WH (2002) Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* **20**:249-58.
- Hunziker EB, Quinn TM and Hauselmann HJ (2002) Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **10**:564-72.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI and Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* **64**:295-312.
- Johnson LL (2001) Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res*:S306-17.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM and Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* **238**:265-72.
- Katz EP, Wachtel EJ and Maroudas A (1986) Extrafibrillar proteoglycans osmotically regulate the molecular packing of collagen in cartilage. *Biochim Biophys Acta* **882**:136-9.
- Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM and Barry F (2002) Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**:457-66.
- Kim WS, Vacanti CA, Upton J and Vacanti JP (1994) Bone defect repair with tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* **94**:580-4.
- Koopman, W.J. 13th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997 Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology. (2 volumes).
- Kopen GC, Prockop DJ and Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:10711-6.
- Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV and Zander AR (2005) High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **14**:70-80.
- Lefebvre V and Smits P (2005) Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**:200-12.
- Li Z, Chen Y, Cao D, Wang Y, Chen G, Zhang S and Lu J (2006) Glucocorticoid Upregulates Transforming Growth Factor- β Type II Receptor and Enhances TGF- β Signaling in Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Endocrinology*.

- Liu Y, Li H, Tanaka K, Tsumaki N and Yamada Y (2000) Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2(XI) collagen gene. *J Biol Chem* **275**:12712-8.
- Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E and Richter W (2005) Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther* **7**:R156-65.
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO and Pittenger MF (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* **4**:415-28.
- Mankin HJ (1982) The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* **64**:460-6.
- Mankin HJ and Thrasher AZ (1975) Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **57**:76-80.
- Maroudas A, Bayliss MT and Venn MF (1980) Further studies on the composition of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* **39**:514-23.
- Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, Lepski G, Finkenzeller G, Stark GB and Sudkamp NP (2006) Mesenchymal stem cells maintain TGF-beta-mediated chondrogenic phenotype in alginate bead culture. *Tissue Eng* **12**:1393-403.
- Mandler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH and Bruckner P (1989) Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol* **108**:191-7.
- Messner, K. (1996). "The longterm prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee. A 14 year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes." *Acta Orthop Scand*(67): 165-68.
- Mok SS, Masuda K, Hauselmann HJ, Aydelotte MB and Thonar EJ (1994) Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *J Biol Chem* **269**:33021-7.
- Moskalewski S, Adamiec I and Golaszewska A (1979) Maturation of rabbit auricular chondrocytes grown in vitro in monolayer culture. *Am J Anat* **155**:339-48.
- Mountford P, Nichols J, Zevnik B, O'Brien C and Smith A (1998) Maintenance of pluripotential embryonic stem cells by stem cell selection. *Reprod Fertil Dev* **10**:527-33.
- Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM and Portner R (2006) Cultivation of three-dimensional cartilage-carrier-constructs under reduced oxygen tension. *J Biotechnol* **121**:486-97.
- Norby DP, Malesud CJ and Sokoloff L (1977) Differences in the collagen types synthesized by lapine articular chondrocytes in spinner and monolayer culture. *Arthritis Rheum* **20**:709-16.
- Ohno S, Tanaka N, Ueki M, Honda K, Tanimoto K, Yoneno K, Ohno-Nakahara M, Fujimoto K, Kato Y and Tanne K (2005) Mechanical regulation of terminal chondrocyte differentiation via RGD-CAP/beta ig-h3 induced by TGF-beta. *Connect Tissue Res* **46**:227-34.
- Otte P (2001) Der Arthrose-Prozeß. Teil 1 : Osteochondrale Strukturen. Novartis Pharma Verlag, Nürnberg, 13-66
- Parsch D, Fellenberg J, Brummendorf TH, Eschlbeck AM and Richter W (2004) Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J Mol Med* **82**:49-55.
- Petit B, Masuda K, D'Souza AL, Otten L, Pietryla D, Hartmann DJ, Morris NP, Uebelhart D, Schmid TM and Thonar EJ (1996) Characterization of crosslinked

- collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultured in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments. *Exp Cell Res* **225**:151-61.
- Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N and Prockop DJ (1999) Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* **75**:424-36.
 - Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143-7.
 - Poole A.R. 1991. In Cartilage: molecular aspects (Eds.: B.K.Hall, S.A. Newmann), CRC Press, Boca Raton, S. 179-211
 - Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E and Roughley PJ (1996) Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J Orthop Res* **14**:681-9.
 - Prockop DJ, Sekiya I and Colter DC (2001) Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* **3**:393-6.
 - Pullig O, Pfander D and Swoboda B (2001) [Molecular principles of induction and progression of arthrosis]. *Orthopade* **30**:825-33.
 - Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH and Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**:62-6.
 - Roark EF and Greer K (1994) Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev Dyn* **200**:103-16.
 - Schmal H, Mehlhorn AT, Fehrenbach M, Muller CA, Finkenzeller G and Sudkamp NP (2006) Regulative mechanisms of chondrocyte adhesion. *Tissue Eng* **12**:741-50.
 - Schmidt MB, Chen EH and Lynch SE (2006) A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* **14**:403-12.
 - Schmid A, Schmid F: Results after cartilage shaving studied by electron microscopy. *Am J Sports Med* **15** (1987) 386-387
 - Schneiderman R, Keret D and Maroudas A (1986) Effects of mechanical and osmotic pressure on the rate of glycosaminoglycan synthesis in the human adult femoral head cartilage: an in vitro study. *J Orthop Res* **4**:393-408.
 - Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG and Prockop DJ (2004) Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res* **19**:256-64.
 - Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A and Noda M (2000) SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* **275**:10738-44.
 - Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL and Prockop DJ (2002) In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4397-402.
 - Shakibaei M, Zimmermann B and Merker HJ (1995) Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study. *J Histochem Cytochem* **43**:1061-9.
 - Shyy JY and Chien S (1997) Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **9**:707-13.

- Simmons PJ and Torok-Storb B (1991) Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* **78**:55-62.
- Singh S, Lee CC and Tay BK (1991) Results of arthroscopic abrasion arthroplasty in osteoarthritis of the knee joint. *Singapore Med J* **32**:34-7.
- Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM and Caplan AI (1999) Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res* **17**:205-13.
- Solursh M (1988) Chondrogenesis: in vitro approaches. *Pathol Immunopathol Res* **7**:48-50.
- Stephens M, Kwan AP, Bayliss MT and Archer CW (1992) Human articular surface chondrocytes initiate alkaline phosphatase and type X collagen synthesis in suspension culture. *J Cell Sci* **103 (Pt 4)**:1111-6.
- Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A and Schwarz J (2001) Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol* **170**:317-25.
- Strehl R, Schumacher K, de Vries U and Minuth WW (2002) Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue Eng* **8**:37-42.
- Szafranski JD, Grodzinsky AJ, Burger E, Gaschen V, Hung HH and Hunziker EB (2004) Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* **12**:937-46.
- Tacchetti C, Tavella S, Dozin B, Quarto R, Robino G and Cancedda R (1992) Cell condensation in chondrogenic differentiation. *Exp Cell Res* **200**:26-33.
- Tepliashin AS, Korzhikova SV, Sharifullina SZ, Chupikova NI, Rostovskaia MS and Savchenkova IP (2005) [Characteristics of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue]. *Tsitologija* **47**:130-5.
- Trippel SB (1995) Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* **43**:129-32.
- Tuan RS (2004) Biology of developmental and regenerative skeletogenesis. *Clin Orthop Relat Res*:S105-17.
- van Susante JL, Buma P, van Beuningen HM, van den Berg WB and Veth RP (2000) Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations. *J Orthop Res* **18**:68-77.
- Venn MF (1978) Variation of chemical composition with age in human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* **37**:168-74.
- Walker GD, Fischer M, Gannon J, Thompson RC, Jr. and Oegema TR, Jr. (1995) Expression of type-X collagen in osteoarthritis. *J Orthop Res* **13**:4-12.
- Wang E, Wang J, Chin E, Zhou J and Bondy CA (1995) Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. *Endocrinology* **136**:2741-51.
- Yaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, Binette F, Tubo R and McPherson JM (1997) Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res* **237**:318-25.
- Yao P, Zhan YQ, Xu WX, Li CY, Yang XM and Hu DR (2003) [Mitogenic effects of growth and differentiation factors on rat liver stem cell WB-F344 in vitro]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **11**:33-6.
- Yoo HJ, Yoon SS, Park S, Park WS, Kim DJ, Lee EB and Song YW (2005) Production and characterization of monoclonal antibodies to mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. *Hybridoma (Larchmt)* **24**:92-7.

- Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM and Johnstone B (1998) The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* **80**:1745-57.
- Yu FY, Lu SB, Cui XM, Zhao B, Xu WJ, Yuan M, Sun MX, Zhang WT and Huang JX (2006) [Biological characterization of rabbit's articular chondrocytes by confluent culture in vitro.]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **44**:848-51.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM and Low WC (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* **174**:11-20.
- Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V and De Crombrughe B (1997) Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* **209**:377-86.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P and Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**:4279-95.
- Baksh D, Davies JE and Zandstra PW (2003) Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol* **31**:723-32.
- Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB and Sporn MB (1993) TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol* **158**:414-29.
- Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R and Quarto R (2003) Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* **287**:98-105.
- Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, Courter DL, Hollander AP, Nahir AM, Langer R, Vunjak-Novakovic G and Freed LE (2002) Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. *Tissue Eng* **8**:73-84.
- Bohme K, Winterhalter KH and Bruckner P (1995) Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor-beta 2 and basic fibroblast growth factor in synergy. *Exp Cell Res* **216**:191-8.
- Bosse Y, Thompson C, Stankova J and Rola-Pleszczynski M (2006) Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**:746-53.
- Brighton CT and Heppenstall RB (1971) Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. An in vitro and in vivo study in rats and rabbits. *J Bone Joint Surg Am* **53**:719-28.
- Cawston T, Billington C, Cleaver C, Elliott S, Hui W, Koshy P, Shingleton B and Rowan A (1999) The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover. *Ann N Y Acad Sci* **878**:120-9.
- Chadjichristos C, Ghayor C, Herrouin JF, Ala-Kokko L, Suske G, Pujol JP and Galera P (2002) Down-regulation of human type II collagen gene expression by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in articular chondrocytes involves SP3/SP1 ratio. *J Biol Chem* **277**:43903-17.
- Chiou M, Xu Y and Longaker MT (2006) Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **343**:644-52.
- Colter DC, Class R, DiGirolamo CM and Prockop DJ (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:3213-8.

- Colter DC, Sekiya I and Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7841-5.
- Curran JM, Chen R and Hunt JA (2005) Controlling the phenotype and function of mesenchymal stem cells in vitro by adhesion to silane-modified clean glass surfaces. *Biomaterials* **26**:7057-67.
- De Luca F (2006) Impaired growth plate chondrogenesis in children with chronic illnesses. *Pediatr Res* **59**:625-9.
- De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH and Fraser JK (2003) Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* **89**:267-70.
- Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI and Charbord P (2002) The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* **170**:73-82.
- Derfoul A, Perkins GL, Hall DJ and Tuan RS (2006) Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* **24**:1487-95.
- Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nesic D, Trub T and Mainil-Varlet P (2005) Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol* **202**:731-42.
- Domm C, Schunke M, Christesen K and Kurz B (2002) Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* **10**:13-22.
- Gebhard PM, Gehrsitz A, Bau B, Soder S, Eger W and Aigner T (2003) Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes. *J Orthop Res* **21**:96-101.
- Gerwin N, Hops C and Lucke A (2006) Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* **58**:226-42.
- Giannouli CC and Kletsas D (2006) TGF-beta regulates differentially the proliferation of fetal and adult human skin fibroblasts via the activation of PKA and the autocrine action of FGF-2. *Cell Signal* **18**:1417-29.
- Goldring MB, Tsuchimochi K and Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **97**:33-44.
- Grigoriadis AE, Aubin JE and Heersche JN (1989) Effects of dexamethasone and vitamin D3 on cartilage differentiation in a clonal chondrogenic cell population. *Endocrinology* **125**:2103-10.
- Gronthos S, Graves SE, Ohta S and Simmons PJ (1994) The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* **84**:4164-73.
- Haynesworth SE, Baber MA and Caplan AI (1996) Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* **166**:585-92.
- Hendriks J, Riesle J and Vanblitterswijk CA (2006) Effect of Stratified Culture Compared to Confluent Culture in Monolayer on Proliferation and Differentiation of Human Articular Chondrocytes. *Tissue Eng*.
- Ho ML, Chang JK, Wu SC, Chung YH, Chen CH, Hung SH and Wang GJ (2006) A novel terminal differentiation model of human articular chondrocytes in three-dimensional cultures mimicking chondrocytic changes in osteoarthritis. *Cell Biol Int* **30**:288-94.

- Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL and Lo WH (2002) Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem Cells* **20**:249-58.
- Ichinose S, Yamagata K, Sekiya I, Muneta T and Tagami M (2005) Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**:561-70.
- Im GI, Jung NH and Tae SK (2006) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors. *Tissue Eng* **12**:527-36.
- Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, Tanaka J and Bunyaratvej A (2004) Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* **320**:914-9.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI and Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* **64**:295-312.
- Jiao Y, Wang D, Han W and Li T (1999) [Effects of growth factors on DNA and collagen synthesis of human mandibular condylar cartilage cells]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **17**:358-60.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM and Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* **238**:265-72.
- Johnstone B and Yoo JU (1999) Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*:S156-62.
- Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P and McGonagle D (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* **46**:3349-60.
- Jones KL and Addison J (1975) Pituitary fibroblast growth factor as a stimulator of growth in cultured rabbit articular chondrocytes. *Endocrinology* **97**:359-65.
- A. Jubel J. Andermahr J. Koebeke H.-J. Häuselmann K. E. Rehm1 Die Therapie von Gelenkknorpeldefekten Dtsch Med Wochenschr 2002; 127: 1904–1908
- Kato Y and Gospodarowicz D (1985) Stimulation by glucocorticoid of the synthesis of cartilage-matrix proteoglycans produced by rabbit costal chondrocytes in vitro. *J Biol Chem* **260**:2364-73.
- Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM and Barry F (2002) Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**:457-66.
- Kawaguchi J, Mee PJ and Smith AG (2005) Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* **36**:758-69.
- Kowalewski S. Deutschkand Radio Berlin. 2005 <http://dradio.de/dlr/sendungen/patentes/341283/>
- Kim H, Suh H, Jo SA, Kim HW, Lee JM, Kim EH, Reinwald Y, Park SH, Min BH and Jo I (2005) In vivo bone formation by human marrow stromal cells in biodegradable scaffolds that release dexamethasone and ascorbate-2-phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **332**:1053-60.
- Kuhne BS and Oschmann P (2002) Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques* **33**:1078, 1080-2, 1084 passim.
- Kuznetsov S.A., Krebsbach P.H., Satomura K., Kerr J., Riminucci M., Benayahu D., Robey P.G. (1997) Single-colony derived strains of human marrow stromal

- fibroblasts form bone after transplantation in vivo, *J. Bone Miner. Res.*, 12: 1335-1347.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH and Moorman AF (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**:62-6.
 - Bassett and Herrmann 1961; Pawelek 1969.
 - Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV and Zander AR (2005) High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **14**:70-80.
 - Lee-Anne Stanton,a,b T. Michael Underhill,a,b and Frank Beiera,b, MAP kinases in chondrocyte differentiation Review *Developmental Biology* 263 (2003) 165–175 Synergistic
 - Lee JE, Kim KE, Kwon IC, Ahn HJ, Lee SH, Cho H, Kim HJ, Seong SC and Lee MC (2004a) Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials* **25**:4163-73.
 - Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH and Hahn SB (2004b) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. *Yonsei Med J* **45 Suppl**:41-7.
 - Locker M, Kellermann O, Boucquey M, Khun H, Huerre M and Poliard A (2004) Paracrine and autocrine signals promoting full chondrogenic differentiation of a mesoblastic cell line. *J Bone Miner Res* **19**:100-10.
 - Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A, Horton WA, Moses HL and Spagnoli A (2006) Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling. *J Bone Miner Res* **21**:626-36.
 - Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL and Lo WH (2003) Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res A* **64**:273-81.
 - Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO and Pittenger MF (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* **4**:415-28.
 - Maetzel A The economic burdet associated with osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and hypertension: a comparative study. *Ann Rheum Dis.* 2004 **63**:395-401.
 - Majumdar MK, Banks V, Peluso DP and Morris EA (2000) Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* **185**:98-106.
 - Marcopoulou CE, Vavouraki HN, Dereka XE and Vrotsos IA (2003) Proliferative effect of growth factors TGF-beta1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Int Acad Periodontol* **5**:63-70.
 - Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E and Fagioli F (2001) Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* **86**:1099-100.
 - McQuillan DJ, Handley CJ, Campbell MA, Bolis S, Milway VE and Herington AC (1986) Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *Biochem J* **240**:423-30.
 - Mehlhorn AT, Schmal H, Kaiser S, Lepski G, Finkenzeller G, Stark GB and Sudkamp NP (2006) Mesenchymal Stem Cells Maintain TGF-beta-Mediated Chondrogenic Phenotype in Alginate Bead Culture. *Tissue Eng* **12**:1393-403.
 - Muraglia A, Cancedda R and Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* **113 (Pt 7)**:1161-6.

- Neidel J, Schulze M and Sova L (1994) Insulin-like growth factor I accelerates recovery of articular cartilage proteoglycan synthesis in culture after inhibition by interleukin 1. *Arch Orthop Trauma Surg* **114**:43-8.
- Ochi K, Derfoul A and Tuan RS (2006) A predominantly articular cartilage-associated gene, SCRG1, is induced by glucocorticoid and stimulates chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* **14**:30-8.
- Oyajobi BO, Lomri A, Hott M and Marie PJ (1999) Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody. *J Bone Miner Res* **14**:351-61.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143-7.
- Prockop DJ, Sekiya I and Colter DC (2001) Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* **3**:393-6.
- Reyes M and Verfaillie CM (2001) Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* **938**:231-3; discussion 233-5.
- Ruscetti FW, Akel S and Bartelmez SH (2005) Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene* **24**:5751-63.
- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG and Prockop DJ (2002a) Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* **20**:530-41.
- Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A and Noda M (2000) SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* **275**:10738-44.
- Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL and Prockop DJ (2002b) In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4397-402.
- Seko, Y., Tanaka, Y., und Tokoro, T. (1995). Influence of bFGF as a potent growth stimulator and TGF- β as a growth regulator on scleral chondrocytes and scleral fibroblasts in vitro. *Ophtalmic Research* **27**, 144-152.
- Shakibaei M, Abou-Rebyeh H and Merker HJ (1993) Integrins in ageing cartilage tissue in vitro. *Histol Histopathol* **8**:715-23.
- Shakibaei M and De Souza P (1997) Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int* **21**:75-86.
- Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC and Prockop DJ (2004) Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells* **22**:823-31.
- Stalinska L and Ferenc T (2005) [The role of TGF-beta in cell cycle regulation]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **59**:441-9.
- Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schutze N, Noth U, Cramer H, Eulert J, Zimmermann U and Hendrich C (2003) Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* **21**:1090-7.
- Sundberg M, Savola S, Hienola A, Korhonen L and Lindholm D (2006) Glucocorticoid hormones decrease proliferation of embryonic neural stem cells through ubiquitin-mediated degradation of cyclin D1. *J Neurosci* **26**:5402-10.

- Tanaka H, Murphy CL, Murphy C, Kimura M, Kawai S and Polak JM (2004) Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. *J Cell Biochem* **93**:454-62.
- Thorogood P.V.Hinchliffe J.R. 1975. An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **33**:581-606.
- Trippel SB (1995) Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* **43**:129-32.
- van Osch GJ, van der Veen SW and Verwoerd-Verhoef HL (2001) In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction. *Plast Reconstr Surg* **107**:433-40.
- Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H and Mathieu E (1994) Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood* **84**:753-63.
- Waller EK, Olweus J, Lund-Johansen F, Huang S, Nguyen M, Guo GR and Terstappen L (1995) The "common stem cell" hypothesis reevaluated: human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* **85**:2422-35.
- Wang J, Luo CJ, Guo CH and Zhang Y (2002) [Mesenchymal stem cells and related factors]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **10**:468-71.
- Wang JE, Solberg R, Okkenhaug C, Jorgensen PF, Krohn CD and Aasen AO (2000) Cytokine modulation in experimental endotoxemia: characterization of an ex vivo whole blood model. *Eur Surg Res* **32**:65-73.
- Wang Y, Kim UJ, Blasioli DJ, Kim HJ and Kaplan DL (2005) In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **26**:7082-94.
- Williams GM, Klein TJ and Sah RL (2005) Cell density alters matrix accumulation in two distinct fractions and the mechanical integrity of alginate-chondrocyte constructs. *Acta Biomater* **1**:625-33.
- Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V and Richter W (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* **48**:418-29.
- Yaeger PC, Masi TL, de Ortiz JL, Binette F, Tubo R and McPherson JM (1997) Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res* **237**:318-25.
- Yang IH, Kim SH, Kim YH, Sun HJ, Kim SJ and Lee JW (2004) Comparison of phenotypic characterization between "alginate bead" and "pellet" culture systems as chondrogenic differentiation models for human mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J* **45**:891-900.
- Yin M, Pacifici M (2001) Vascular regression is required for mesenchymal condensation and chondrogenesis in the developing limb. *Dev. Dyn.* **222**, 522–533.
- Yoo HJ, Yoon SS, Park S, Park WS, Kim DJ, Lee EB and Song YW (2005) Production and characterization of monoclonal antibodies to mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. *Hybridoma (Larchmt)* **24**:92-7.
- Zhang YF, Cheng XR, Shi B and Xu DX (2006) [Chondrogenic differentiation of adult human periodontal ligament stem cells in vitro]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* **41**:216-9.

- Zohar R, Sodek J and McCulloch CA (1997) Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood* **90**:3471-81.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an meine Doktormutter Prof. Dr. U. Beisiegel für die herzliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, für die stete und engagierte Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Hanelt möchte ich mich ausdrücklich für die Übernahme des Zweitgutachtens am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg bedanken.

Herrn PD Dr. P. Adamietz danke ich sehr für die Heranführung an das Thema, für den vielseitigen fachlichen Rat sowie die engagierte Betreuung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

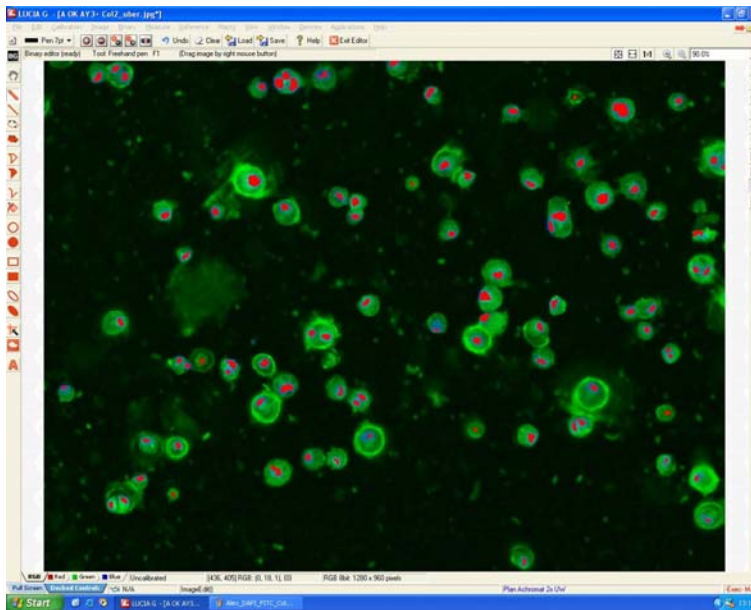
Weiteren Dank schulde ich meinen Mitdoktoranten für die großartige kollegiale Unterstützung, für die anregenden Ratschläge und für den persönlichen Umgang.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie danke ich für die hilfsreiche Unterstützung und für die sehr nette Arbeitsatmosphäre.

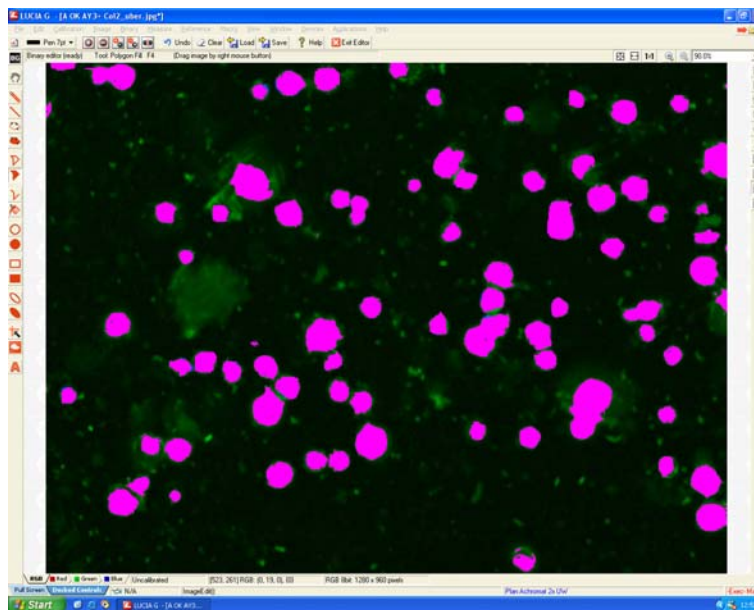
Meine Familie, die mich immer unterstützt hat.

Die Screenshots von der Auswertung der Cytospins

A:



B:



Die Auswertung der Cytospins

Die Bilder zeigen exemplarisch die Auswertung der Cytospins (Screenshots)
 Aufnahme der Bilder von den Cytospins mithilfe des Fluoreszenzmikroskops wurden
 mithilfe des Programms Lucia G (Nikon GmbH, Düsseldorf) ausgewertet

A: DAPI gefärbte Zelle wurden von dem Programm gezählt.

B: Die Kollagen II Markierung konnte mithilfe des Programms ausgewertet.

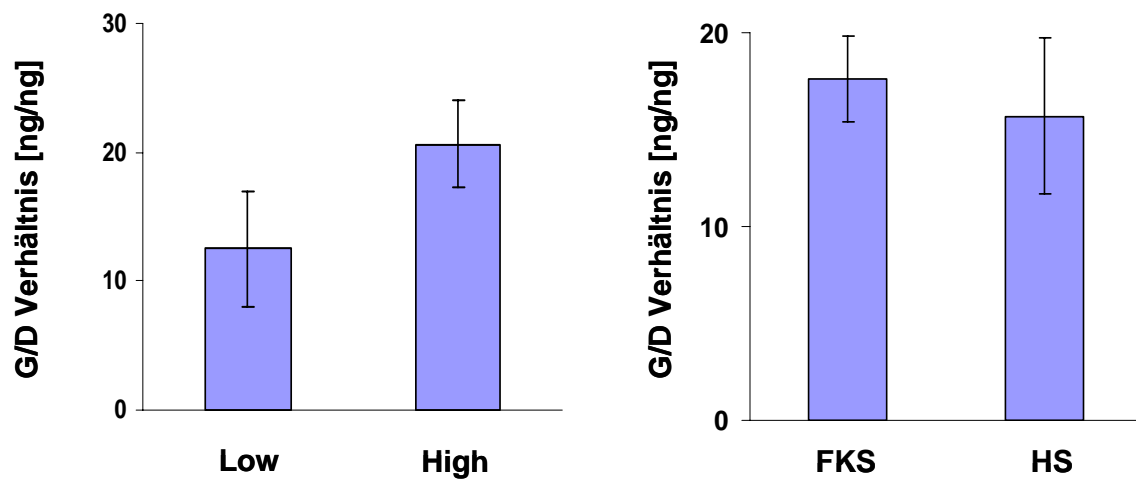
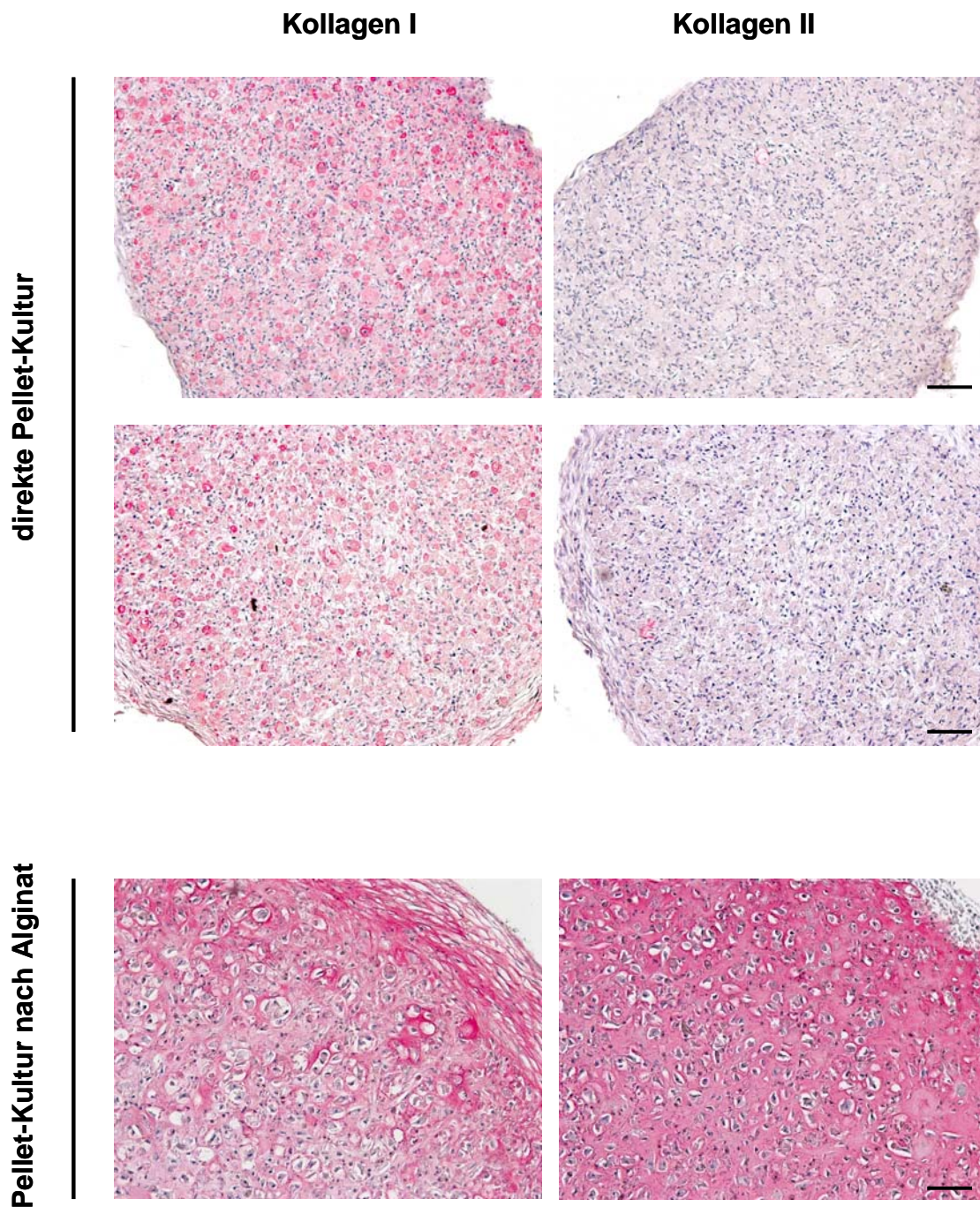


Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Differenzierung im Alginat von der Verwendung humanes bzw. fötales Serums (A) und der Anwendung High Glucose bzw. Low Glucose:

Die GAG- und DNA-Analyse der Pellet-Kultur nach Alginat. Die Zellen wurde im Alginat mit High Glucose (High 4500 mg/L) Medium bzw. Low Glucose (Low 1000 mg/L) kultiviert. (A) (n=4). Die Anwendung humanes Serum (HS) statt fötales Kälberserum (FKS) hatte wieder Vorteile noch Nachteile hinsichtlich GAG-Produktion (B). (angegeben sind die Mittelwerte unter Verwendung der Standardbedingungen in Alginat- und Pellet-Kultur, (n= 3.)

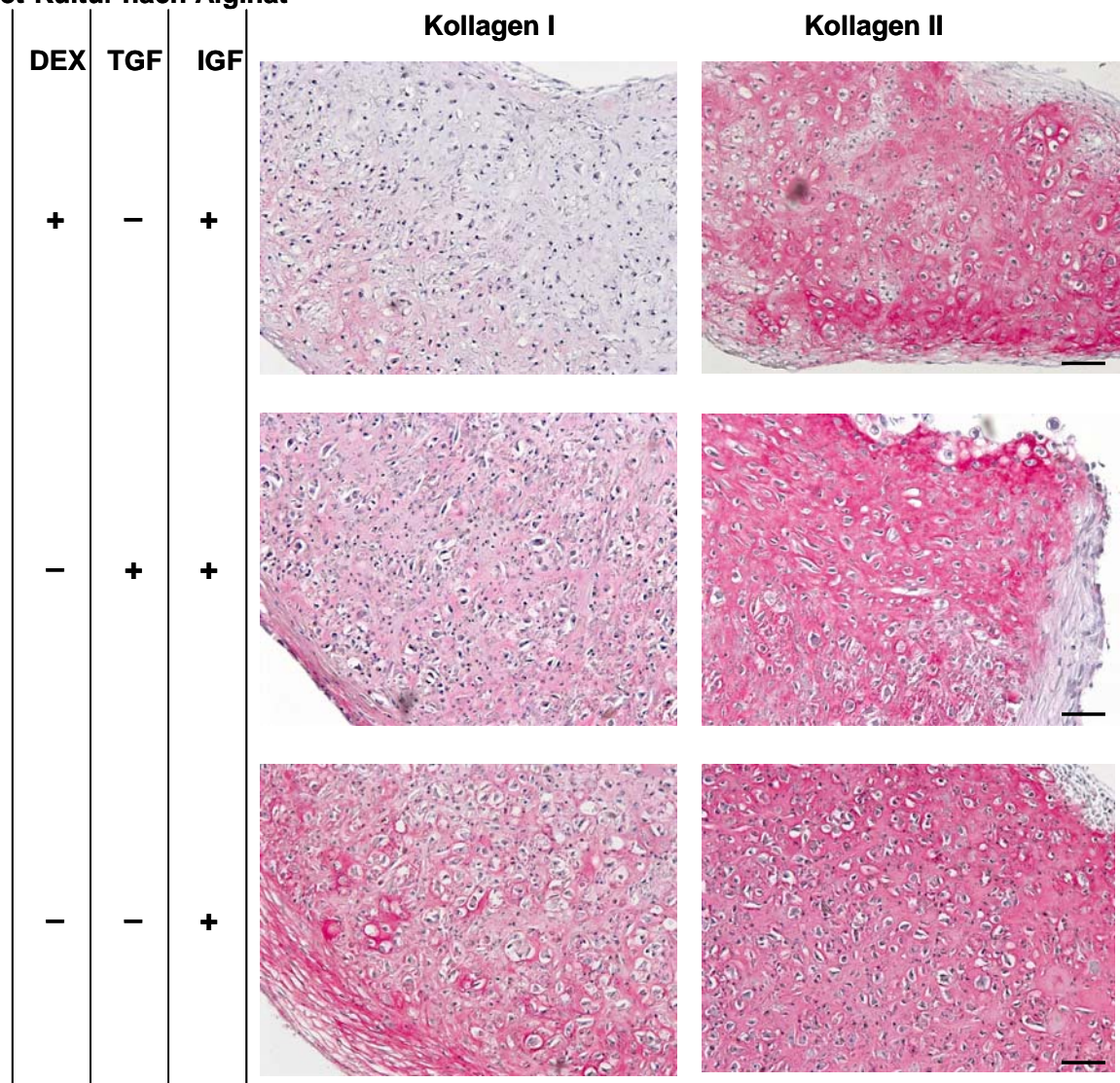
Immunohistologie von Pellet-Kulturen mit bzw. ohne Alginat-Kultur

(Maßstabbalken 100 µm Standardbedingungen)



Immunohistologie von Pellet-Kulturen nach Alginat-Kultur

(Maßstabbalken 100 µm Standardbedingungen im Alginat)

Pellet-Kultur nach Alginat

Kolonie-Bildene Zellen

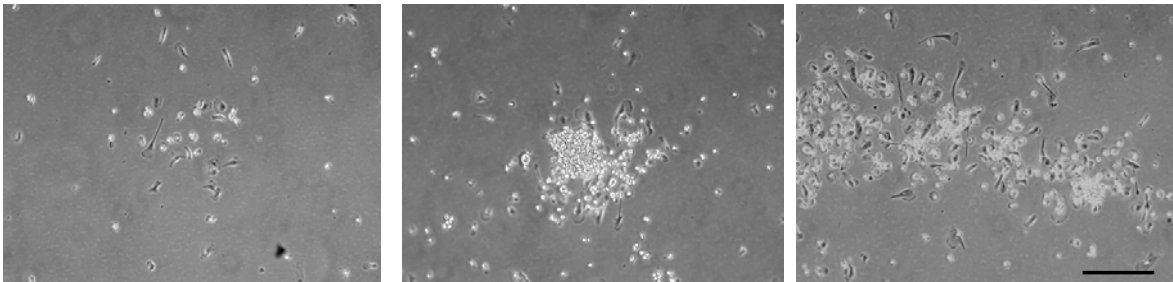
(Maßstabbalken 100 μm , Standardbedingungen representative Bilder)

nach der Isolierung...

2 Tage

4 Tage

6 Tage



Abhängigkeit der Morphologie der Zellen von der Aussaatdichte

(Maßstabbalken 100 μm , Standardbedingungen representative Bilder)

