

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Abteilung für Unfall-, Hand und Wiederherstellungschirurgie
der Universitätsmedizin Rostock
Direktor: Prof. Dr. Thomas Mittlmeier

**Untersuchungen zum Vergleich des *in vitro*
Differenzierungspotentials von humanen mesenchymalen
Progenitor-Zellen und osteoarthrotischen mesenchymalen
Progenitor-Zellen**

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universitätsmedizin Rostock



vorgelegt von
Andreas Eugen Enz
geb. am 07.05.1981 in Bamberg

Rostock im August 2015

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil C. Reisinger

1. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. med. habil. Thomas Mittlmeier, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie, Schillingallee 35, 18057 Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Michael Sittinger, Labor für Tissue Engineering & Berlin-Brandenburg Centrum für Regenerative Therapien, Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie, Charitéplatz 1 / Virchowweg 11/E6, 10117 Berlin

3. Gutachter

Prof. Dr. med. habil. Stefan Rammelt, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, UniversitätsCentrum für Orthopädie & Unfallchirurgie, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden

Datum der Verteidigung: 11.05.2016

Inhaltsverzeichnis	3
Einleitung	5
1.1 Klinische Grundlagen	6
1.1.1 Inzidenz Knorpeldefekte	6
1.1.2 Pathologie	7
1.1.3 Klassifikation	8
1.1.4 Therapie	9
1.1.4.1 Konservative Therapie	9
1.1.4.2 Operative Therapie	9
1.1.5 Zelluläre Grundlagen	13
1.1.5.1 Progenitorzellen	13
1.1.5.2 <i>in vitro</i> Zellkultur	14
1.1.5.3 Zellgene	16
2 Fragestellung	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Zellgewinnung, Isolierung und Kultivierung	20
3.2 Wachstumskinetik	21
3.3 Flowzytometrische Analyse	22
3.4 Differenzierung	23
3.4.1 Chondrogene Differenzierung	23
3.4.2 Osteogene Differenzierung	24
3.4.3 Adipogene Differenzierung	25
3.5 Histologische, histochemische und immunhistochemische Analyse	25
3.6 Genexpressionsanalyse	29
4 Ergebnisse	31
4.1 Morphologie und Wachstumskinetik	31
4.2 Zelloberflächenantigene	32
4.3 Chemotaxis und Zellmigration	33
4.4 Chondrogene Differenzierung	35

Einleitung	4
4.5 Adipogene Differenzierung	41
4.6 Osteogene Differenzierung	42
4.7 Genexpressionsanalyse der oaMPC	43
4.8 Vergleich der Zellen	47
5 Diskussion	48
6 Thesen	55
7 Zusammenfassung	57
8 Anhang	59
9 Abbildungsverzeichnis	67
10 Abkürzungsverzeichnis	70

1 Einleitung

Die Chondropathie und ihr Endstadium, die Arthrose, kann mittlerweile zu den sogenannten Volkskrankheiten gezählt werden und stellt weltweit die häufigste Gelenkerkrankung dar (1). Ein Übermaß an Belastung, angeborene (Dysplasie) oder traumatisch erworbene Defekte, sind als Ursache anzuführen. Bei traumatisch bedingter Arthrose unterscheidet man zwischen Frakturen ohne Gelenkbeteiligung. Hier ist eine Achsfehlstellung mit Belastungsverschiebung ursächlich, bei Frakturen mit Gelenkbeteiligung kommt es zu einer direkten Schädigung des Knorpels (2). Die Osteonekrose und die Osteochondrosis Dissecans führen ebenso zu Knorpelschädigungen. Die unterschiedlichen Ätiologien münden jedoch im selben klinischen Bild mit Bewegungseinschränkungen, Belastungs- und Ruheschmerzen und entsprechendem Leidensdruck der Patienten (3,4). Im Endstadium der Arthrose, dem völligen Verschleiß des hyalinen Gelenkknorpels, ist heutzutage der endoprothetische Oberflächengelenkersatz die einzige Therapieoption. Zur Behandlung der Zwischenstadien des Verschleißes konnten sich neben unterschiedlichen medikamentösen Therapieansätzen, wie intraartikuläre Injektionen und orale Einnahme von sogenannten symptomatic slow acting drugs in osteoarthritis (SYSADOA) oder krankheitsmodifizierenden Arthrose-Medikamenten (DMOADs) und konservativen Maßnahmen wie Orthesen-Versorgung und physiotherapeutischen Maßnahmen, auch operative Maßnahmen etablieren. Diese sind nach Ausschöpfen der konservativen Therapiemöglichkeiten und Schmerzpersistenz frühzeitig zur Verhinderung sekundär-degenerativer Prozesse indiziert. Hier haben markraumeröffnende Verfahren, osteochondrale Transplantate, autologe Chondrozytentransplantation und gelenknahe Umstellungs-osteotomien ihren Stellenwert (5).

Bei traumatischen und fokal degenerativen Knorpeldefekten von 0,5-2,0 cm² wird hierbei häufig die Methode der Mikrofrakturierung im Zuge einer Arthroskopie angewendet (vgl. Pridie-Bohrung). Dabei wird im geschädigten Areal mittels gewinkelter Ahle oder Bohrdraht der subchondrale Knochen unter dem Defekt angebohrt, um mesenchymale Stamm- und Vorläuferzellen mit der auftretenden Knochenmarkblutung in den Defekt zu spülen. Diese werden von subchondralen Wachstumsfaktoren oder von der Synovialflüssigkeit in Richtung einer chondrogenen Differenzierung aktiviert. Im Verlauf lässt sich die Ausbildung von (oftmals minderwertigem) Reparaturgewebe beobachten, mit zufriedenstellenden klinischen Kurzeitergebnissen (6). Zur Unterstützung kann eine dreidimensionale resorbierbare Trägerstruktur zur besseren Zelldifferenzierung in den Knorpeldefekt implantiert werden. Diese dient als Träger- und Leitstruktur der einströmenden Stamm- und Vorläuferzellen (7). Das

Differenzierungspotential dieser Vorläuferzellen bei Patienten mit Osteoarthrose und somit die suffiziente Bildung von Reparaturgewebe ist jedoch unklar.

1.1 Klinische Grundlagen

1.1.1 Inzidenz Knorpeldefekte

Die Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung bei Erwachsenen. Mit Gonarthrose gefolgt von Cox- und Omarthrose sind insbesondere die großen Gelenke des Menschen betroffen (2,8) In ca. 60 Prozent aller bei Knieschmerzen durchgeführten Arthroskopien lassen sich Knorpelschäden dokumentieren, 44 Prozent zeigen bereits eine Arthrose, bei 28% lagen isolierte Knorpelschäden vor.

Mit fortschreitendem Lebensalter steigt auch das Risiko an einer Arthrose zu erkranken. Vor allem Männer > 60 Jahre sind mit 10 Prozent häufig betroffen (2,3,5,9). Ab dem 70. Lebensjahr steigt die Wahrscheinlichkeit einer Gonarthrose auf bis zu 40 Prozent (10) (Abbildung 1). Die radiologisch gesicherte Arthrose deckt sich jedoch in nur 15 Prozent der Fälle mit der klinischen Symptomatik, häufig bleiben klinische Beschwerden lange aus (11). So sinkt die Prävalenz im Erwachsenenalter auf 10 Prozent (10).

Beim Entstehen einer Arthrose können exogene und endogene Ursachen ausgemacht werden. Als endogene Risikofaktoren werden vor allem Alter, Geschlecht und genetische Prädisposition genannt. Exogene Risikofaktoren sind Makrotraumen, repetitive Mikrotraumen, BMI und resezierende Gelenkeingriffe. Ein einzelner Faktor führt dabei nicht unweigerlich zur Arthrose. Häufig ist es ein multifaktorielles pathologisches Szenario. Posttraumatisch gesehen ist die Wahrscheinlichkeit eines Knorpelschadens deutlich erhöht. (12).

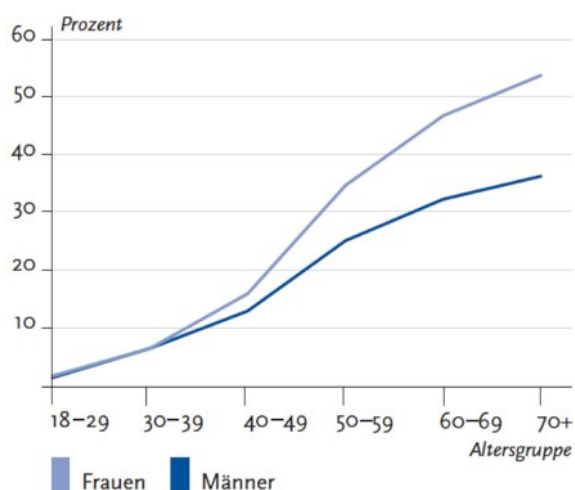


Abbildung 1: Lebenszeitprävalenz der Arthrose Quelle: GEDA 2010 Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 54 Arthrose

1.1.2 Pathologie

Die Gelenke sind im Artikulationsbereich mit hyalinem Knorpel überzogen. Dieser Knorpel zeigt im Gelenk einen typischen Aufbau. Histologisch sind die Chondrozyten in Chondronen organisiert und von extrazellulärer Matrix umgeben. Diese ist reich an Kollagen Typ II und Proteoglykanen. Daraus folgt in Verbindung mit Wasser und Ionenbindung die stoßdämpfenden und gleitenden Funktionen des hyalinen Knorpels. Beim Gelenkknorpel fehlt das den Knorpel überspannende und der Ernährung dienende Perichondrium sowie eine direkte Blutversorgung. Die Versorgung der Knorpelzellen mit Nährstoffen erfolgt durch Diffusion. Ein hyaliner Knorpel weist somit eine geringe Stoffwechselintensität auf und wird zu den bradytrophen Geweben gezählt. Das dynamische Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix wird durch anabole (insulin like growth factor I und II) und katabole Wachstumsfaktoren (Tumornekrosefaktor α) aufrechterhalten. Risikofaktoren stören dieses Gleichgewicht. Kommt es bei geringer Stoffwechselintensität nun auch noch zur Überbeanspruchung des Knorpels, folgt eine Degeneration der Matrix, die aufgrund der Braditrophität des Gewebes nicht kompensiert werden kann. Genaue Gründe für die Degeneration sind bisher nicht bekannt. Bislang wird von einem Leistungsverlust der Chondrozyten und somit weiteren Matrixschwächungen ausgegangen. Knorpelschäden bis hin zur Arthrose sind die Folgen (4,12,13,14) (Abbildung 2).

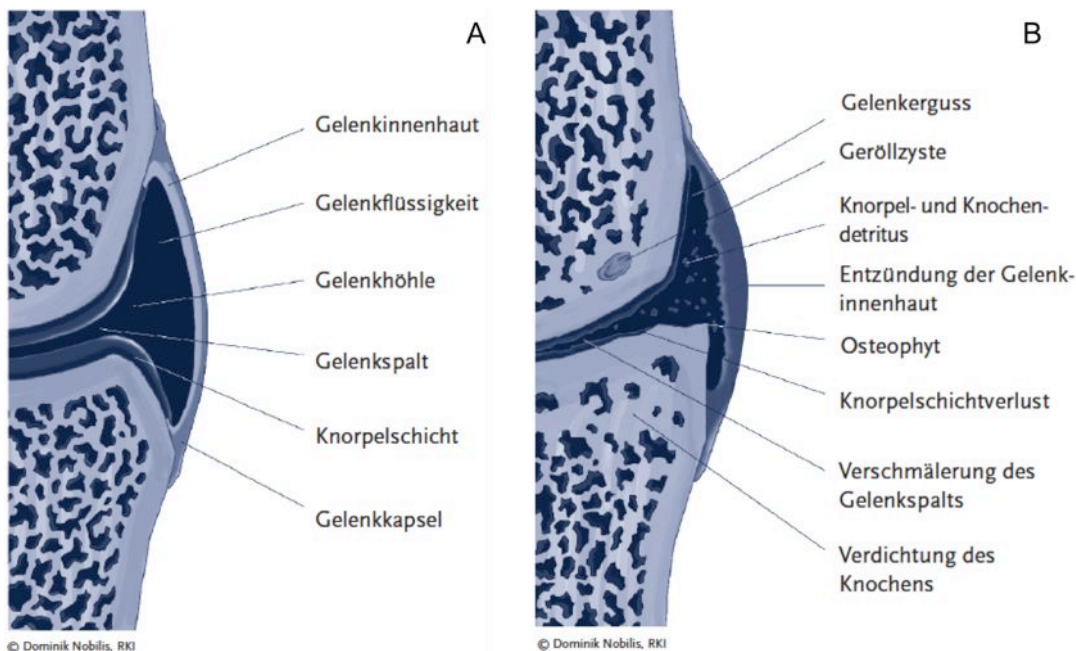


Abbildung 2: Schematischer Vergleich: Gesundes Gelenk (A) und arthrotisches Gelenk (B) Quelle: Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 54 Arthrose

1.1.3 Klassifikation

Zur Klassifikation von Knorpeldegenerationen haben sich diverse Einteilungen etabliert. Die 1961 eingeführte Outerbridge-Klassifikation wurde im Jahr 2003 von der International Cartilage Research Society (ICRS) erweitert und wird heute als ICRS Hyalin Cartilage Lesion Classification System zu den internationalen Standardklassifikationen gerechnet (Tabelle 1) (3,15).

Tabelle 1: Einteilung von Knorpelläsionen

ICRS Hyalin Cartilage Lesion Classification System	
• Grad 0	- keine erkennbaren Defekte
• Grad 1a	- intakte Oberfläche, Fibrillationen und/oder leichte Erweichung
• Grad 1b	- zusätzliche oberflächliche Risse / Fissuren
• Grad 2	- Läsionstiefe <50% der Knorpeldicke
• Grad 3a	- >50% Tiefe der Knorpeldicke, nicht bis zur kalzifizierenden Schicht
• Grad 3b	- >50% Tiefe der Knorpeldicke, bis zur kalzifizierenden Schicht
• Grad 3c	- >50% Tiefe der Knorpeldicke, bis zur subchondralen Platte
• Grad 3d	- >50% Tiefe der Knorpeldicke, mit Blasenbildung
• Grad 4	- vollständige Knorpelläsion, Durchbruch subchondrale Platte

Zur Stadieneinteilung von konventionellen Röntgenbildern hinsichtlich einer Arthrose wird die Einteilung nach Kellgren und Lawrence angewendet. Beurteilt werden in zwei Ebenen (a.p. und streng lateral) angefertigten Röntgenaufnahmen (16) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Kellgrenscore

Stadieneinteilung nach Kellgren und Lawrence	
• Grad 0	- ohne Befund
• Grad 1	- initiale Arthrose, beginnende Osteophyten an Eminentia
• Grad 2	- mäßige Gelenkspaltverschmälerung, mäßige subchondrale Sklerosierung
• Grad 3	- Gelenkspaltverschmälerung >50%, Entrundung Femurkondylus, ausgedehnte subchondrale Sklerosierung, ausgeprägte Osteophyten
• Grad 4	- Gelenkdestruktion, Gelenkspalt komplett aufgehoben, Geröllzysten, Subluxationstellung

1.1.4 Therapie

Die Leitlinien gerechte Therapie der Arthrose differenziert sich in ein konservatives und nach Erschöpfung von diesem in ein operatives Konzept. Diese Konzepte werden individuell auf den Patienten angepasst. Eine der Entwicklung der Erkrankung entsprechende auf einzelne Krankheitsstadien beziehende Behandlung hat sich dabei noch nicht etabliert (5).

1.1.4.1 Konservative Therapie

Die konservative Therapie fußt auf mehreren Therapiezielen und orientiert sich dabei an einem Stufenschema. Zielsetzung ist die Schmerzlinderung und Verbesserung von Lebensqualität, Beweglichkeit, Gehleistung und eine Verzögerung der Progredienz der Arthrose. Neben allgemeinen Maßnahmen wie Aufklärung, Anpassung der Lebensweise und Gewichtsreduktion finden physiotherapeutische und physikalische Maßnahmen wie Bewegungstherapie, Ultraschallanwendungen zur Schmerzlinderung, Wärme- und Kältetherapie, Querfraktion (Massagetechniken), Akupunktur und Elektrotherapie Anwendung. Orthopädische Heil- und Hilfsmittel wie Pufferabsätze zur Dämpfung sowie Schuhrand erhöhungen zur Belastungszonenverschiebung und Orthesen-Versorgung finden ebenso Anwendung (2,17).

Zum optimalen Management der Beschwerden bedarf es auch einer medikamentösen Therapie. Hier etablierten sich nicht-steroidale Antirheumatika (Cyclooxygenase-Hemmer), bei fortgeschrittener Arthrose in Kombination mit Opioiden. Intraartikuläre Injektionen mit Glukokortikoiden und Hyaluronsäure führen ebenfalls zu einer Schmerzreduktion. Oral und intraartikulär eingesetzt werden „slow acting drugs in osteoarthritis“ (SADOA) wie Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat, die wiederum als „symptomatic slow-acting drugs in osteoarthritis“ (SYSADOA) und „disease modifying osteoarthritis drugs“ (DMOAD) zusammengefasst werden (2,5). Die Wirkungsweise der SADOAs ist bisher ungeklärt, klinisch lässt sich jedoch eine signifikante Reduktion der Schmerzen und Verbesserung der Funktion nachweisen (5,18). Nach Ausschöpfen dieser Therapieoptionen sind dann operative Maßnahmen indiziert.

1.1.4.2 Operative Therapie

Verschiedene operative Optionen haben sich in den vergangenen Jahren und Jahrzehnten etabliert. Unterschieden werden gelenkerhaltende und gelenkersetzende Verfahren. Zu den gelenkerhaltenden Operationsmethoden zählen symptomatische und knochen- und knorpelstimulierende Eingriffe, Operationen zur Gelenkflächenrestitution und gelenknahe Umstellungen (Abbildung 3). Endoprothesen stellen die gelenkersetzende und derzeit endgültige Therapieoption dar.

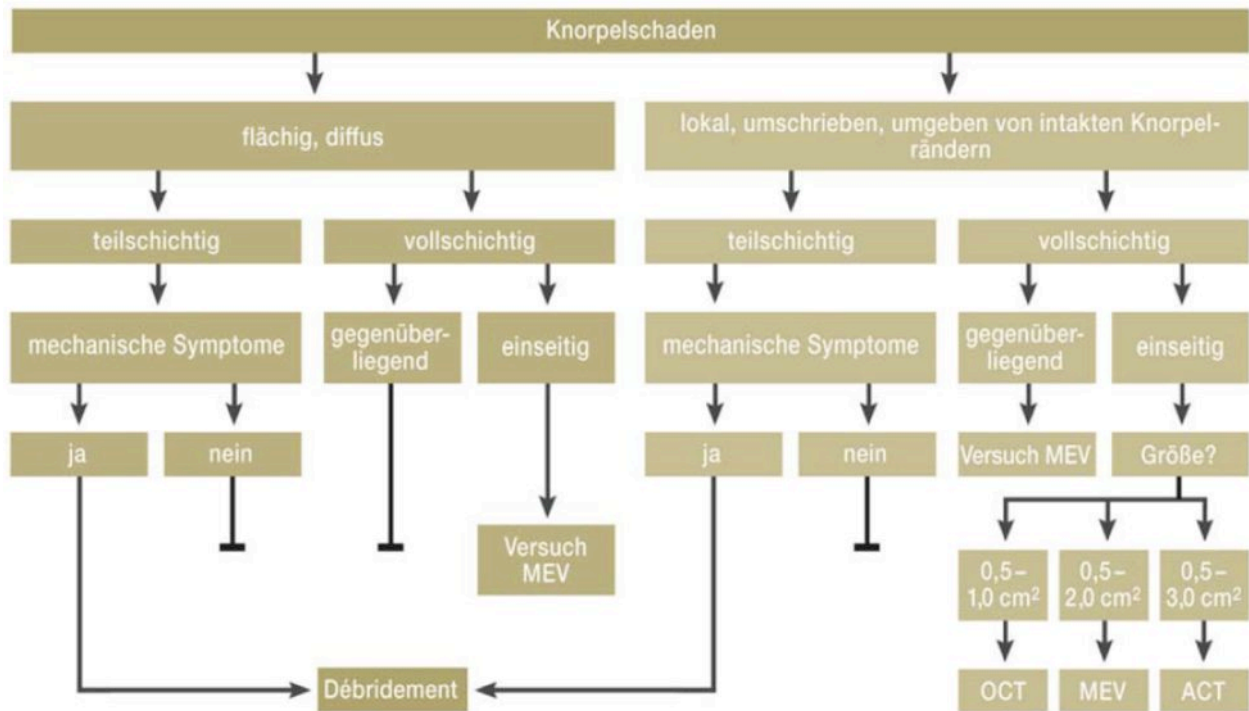


Abbildung 3: Fließschema zur gelenkerhaltenden Versorgung Quelle: Madry H, Grün UW, Knutsen G: Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. Dtsch Arztebl Int 2011; 108(40): 669–77

Symptomatische Operationen

Diese Gruppe umfasst die Operationsmethoden Lavage, Shaving (=Chondroplastik) und Débridement, die im Zuge einer Gelenksarthroskopie minimalinvasiv durchgeführt werden. Die Lavage dient lediglich dem Spülen des Gelenkes und Entfernung von Detritus und Entzündungsmediatoren. Bei der Chondroplastik werden degenerativ oder traumatisch bedingte Knorpelauffaserungen und Knorpeldelaminierungen mittels geeigneten Instrumenten wie Shaver und manuellen Stanzen abgetragen und Knorpelränder geglättet. Das Débridement (=Gelenktoilette) dient der Entfernung freier Gelenkkörper sowie der Resektion von Osteophyten. Diese Maßnahmen werden in der Regel kombiniert durchgeführt. Eine Überlegenheit einer Methode ist nicht nachgewiesen (19).

Umstellungsosteotomie

Bei der Umstellungsosteotomie soll ein Verkippen der Belastungsachse, den Belastungsschwerpunkt zur gesunden Seite hin zu verlagern (Lastwechsel) und somit Erleichterung verschaffen. Dies kann entweder durch einen Eingriff proximal tibial oder distal femoral erzielt werden. Unterschieden werden hierbei additive (open wedge) und subtraktive

(closed wedge) Verfahren. Bei valgierender Korrektur von mehr als 8 Grad werden in der Regel subtraktive Verfahren favorisiert (20).

Knochenstimulierende Operationsmethoden

Pridie-Bohrung, Mikrofrakturierung und Abrasionsplastik werden wie die Gruppe der symptomatischen Verfahren arthroskopisch durchgeführt (Abbildung 4). Im Bereich des geschädigten Knorpelareals wird invasiv mittels Ahle, Meisel, Bohrer oder Fräse der subchondrale Knochen eröffnet. Das Ziel besteht darin die dort lokalisierten Stammzellen durch den auftretenden Blutfluss in den geschädigten Bereich strömen zu lassen, wo sie in Verbindung mit Zytokinen, Fibringerinnungsprodukten und Wachstumsfaktoren Knorpel bzw. Reparaturgewebe ausbilden. Zur Unterstützung kann eine resorbierbare Trägerstruktur in den Knorpeldefekt implantiert werden, welche den Zellen als Träger- und Leitstruktur dient. Jedoch unterscheidet sich dieser Reparaturknorpel deutlich in seinen biomechanischen Eigenschaften von hyalinen Gelenknorpel, denn er ist weicher und deutlich weniger stoßfest (6,7,21).

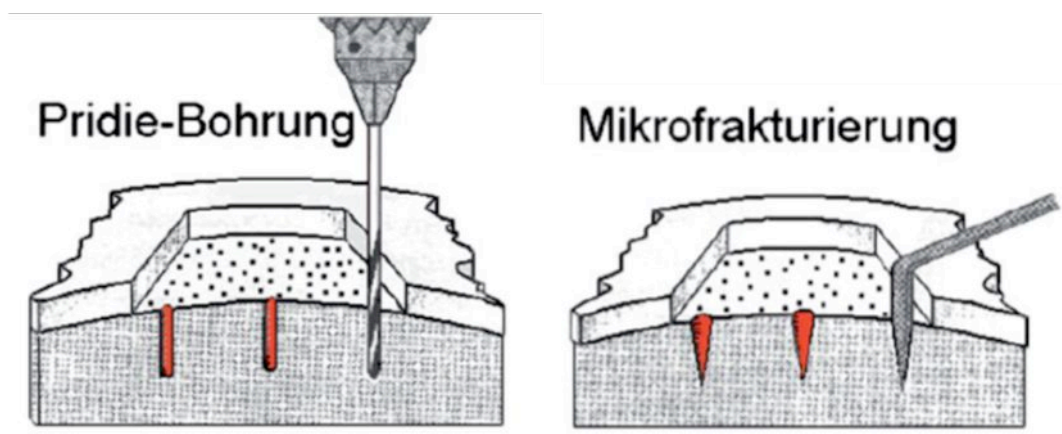


Abbildung 4: Durchföhrung der Pridie-Bohrung und der Mikrofrakturierung Quelle: Der Arthrose-Prozess Teil 2 Gelenkdeformation: Biomechanik

Gelenkoberflähenrestitution

Bei Autologen Osteochondralen Transplantationen (OCT) werden aus belastungsfreien Gelenkgebieten Knochenknorpelzylinder mittels Stanzen entnommen und in umschriebene Defektgebiete wieder eingesetzt. Diese Methode wird auch als Mosaikplastik oder Osteochondrale Autologe Transfersystem (OATS)-Plastik bezeichnet und eignet sich ebenfalls für umschriebene Knorpeldefekte wie der Osteochondrosis Dissecans (21).

Die Autologe Chondrozyten Transplantation (ACT) ist zur Deckung von begrenzten posttraumatischen Knorpeldefekten geeignet. Hierbei werden dem Patienten Knorpelzellen aus

nicht belasteten Gelenkanteilen entnommen, im Labor vermehrt und bei einer zweiten Operation in Form einer Zellmatrix (3. Generation) auf den vorher aufbereiteten Knorpeldefekt implantiert. Die Knorpelmatrix kann so in die Defektzone einheilen.

Die bereits etablierte Methode der Autologen Chondrozyten Transplantation beruht auf einem zweizeitigen Vorgehen. Einer Voroperation zur Entnahme von Knorpelgewebe und nach erfolgreicher Züchtung einer Knorpelmatrix folgt die endgültige operative Versorgung. Als Weiterentwicklung gilt in Kombination mit einer Mikrofrakturierung die Verwendung von zellfreien bioresorbierbaren 3D-Matrixen, die mit chemotaktischen Lockstoffen versetzt, Zellen zum Invaginieren und vor Ort zur Differenzierung anregen. Diese 3D -Matrix wird bei entsprechend aufbereiteten Defektareal während einer Operation eingebracht und hilft hyalinartiges Reparaturgewebe auszubilden (22). Analog dazu entwickelte sich die Autologe Matrixinduzierte Chondrogenese (AMIC-Verfahren). Hier wird eine zweilagige Kollagen I/III Membran als Trägerstruktur nach Mikrofrakturierung in den aufbereiteten Defekt gebracht, die bei der Bildung von höherwertigen Knorpelgewebe hilft (23). Langzeitergebnisse stehen bei diesen Methoden jedoch noch aus.

Tissue Engineering

Die Selbstheilungsfähigkeit des Körpers stellt das zentrale Element der gelenkerhaltenden Operationen dar. Vor allem im Bereich des Tissue Engineerings nutzt man diese Fähigkeit aus, um körpereigenes Gewebe zu rekonstruieren (24). Zu Beginn wurden zur Deckung von Knorpeldefektzonen zellbasierte Ansatzpunkte mit vom Bestimmungsort entnommenen Zellen verfolgt. Unterschiedliche autologe Gewebe konnten so *in vitro* gezüchtet, vervielfältigt und *in vivo* transplantiert werden (25). Im weiteren Verlauf entwickelten sich Reparaturmethoden die auf zellfreien Polyglykolsäure Matrixen beruhten. Die PGA-Matrix, die mit Humanserum durchtränkt ist, wird auf einen durch Mikrofrakturierung vorbereiteten Knorpeldefekt im betreffenden Gelenk eingebracht (26). Die aus dem eröffneten subkortikal gelegenen Gewebe resultierende Blutung schwemmt mesenchymale Stamm- und Vorläuferzellen in die Matrix. Der Selbstheilungsprozess geht vom Differenzierungspotential der eingeschwemmten Zellen aus, die ein Reparaturgewebe ausbilden und somit den Defekt decken (27). Deutlich besser erforscht als Vorläuferzellen sind humane mesenchymale Stammzellen, die bekanntermaßen für die Reparatur von mesenchymalen Gewebe verantwortlich sind. Aus ihnen kann jegliches mesenchymale Gewebe entstehen (28). Definitionsgemäß liegt der Unterschied zwischen mesenchymalen Stammzellen und mesenchymalen Vorläuferzellen in der höheren Differenzierungspotenz und dem höheren Regenerationspotential von Stammzellen (29). Zu den Quellen von mesenchymalen Stammzellen zählen Knochenmark, Fettgewebe, Blut und

Nabelschnurblut (30). Das bei Mikrofrakturierung eröffnete subchondrale Gewebe zählt nicht zu den definierten Zellquellen, da bei einer Eröffnungstiefe von ca. 2-3mm der Markraum nicht eröffnet wird (27). Das subchondral gelegene Gewebe konnte bereits im Jahr 2008 von unserer Forschungsgruppe als Quelle von mesenchymalen Vorläuferzellen identifiziert werden (31). Diese erfüllten die von der internationalen Gesellschaft für Zelltherapie aufgeführten Kriterien für Stammzellen mit positiven Oberflächenzellantigenen CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166 und fehlendem Nachweis der Antigene CD14, CD34 und CD45. (31)

Prognose und Verlauf

Die Versorgungsansätze und Möglichkeiten sind vielschichtig. Die Prävention stellt einen zentralen Pfeiler bei der Genese der Arthrose um schädigende Noxen zu reduzieren oder zu eliminieren, dar. Entstehung und Progredienz können zumindest verlangsamt, jedoch nicht gestoppt oder geheilt werden (2, 5).

Gelenkerhaltende Operationen haben ihren sicheren Stellenwert in der Therapie der Arthrose, erreichen aber ebenfalls bisher nur die Verlangsamung des Abnutzungsprozesses. Langzeitstudien bei Therapien mit ACT oder Mikrofrakturierung (mit Trägerstruktur) hinsichtlich biomechanischer Eigenschaften und Langzeitüberleben fehlen bisher oder sind wenig aussagekräftig und etablieren sich somit nur zögerlich in der Medizin (32). Gesichert ist bei knochenstimulierenden Therapien (ohne Trägerstruktur) bisher trotz vermuteten Vorläuferstatus der einschwemmenden Zellen die Ausbildung von minderwertigen Reparatur- oder Faserknorpel (33,34).

Somit bleibt bei großen Knorpeldefekten und im Endstadium der Arthrose nur die Versorgungsmöglichkeit mittels Totalendoprothese als derzeitiger Goldstandard.

1.1.5 Zelluläre Grundlagen

1.1.5.1 Progenitorzellen

Auf Zellebene teilt man je nach Fähigkeit und Differenzierungskapazität Stammzellen in omni-, pluri- und multipotente Zellen ein. Omnipotente Stammzellen (Zygote) können sich spontan zu jedem Zelltyp eines Organismus differenzieren und somit einen ganzen Organismus entwickeln. Pluripotente embryonale Stammzellen können kein extraembryonales Gewebe bilden und sind somit nicht in der Lage einen ganzen Organismus zu bilden, verfügen jedoch über die Kapazität, sich zu jedem Zelltyp innerhalb eines Organismus zu differenzieren.

Stammzellen aus dem Bindegewebe wie zum Beispiel aus dem Knochenmark besitzen ein multipotentiales Differenzierungspotenzial und können sich innerhalb ihrer Zelllinie in jede Zelle

differenzieren. Sie besitzen das Potential Knochen-, Knorpel-, Fett-, Sehnen-, Muskeln- und Bindegewebszellen auszubilden. Diese Vorläuferzellen können isoliert und unter Laborbedingungen vermehrt werden, ohne dass sie ihren multipotenten Status verlieren. Die so gewonnenen Zellen könnten mit Hilfe von Induktoren zur Entwicklung in eine Zellgruppe, wie zum Beispiel Knorpelzellen, angeregt werden und *in vitro* sowie *in vivo* ihrer Aufgabe der Gewebeneubildung nachkommen (28,35) (Abbildung 5).

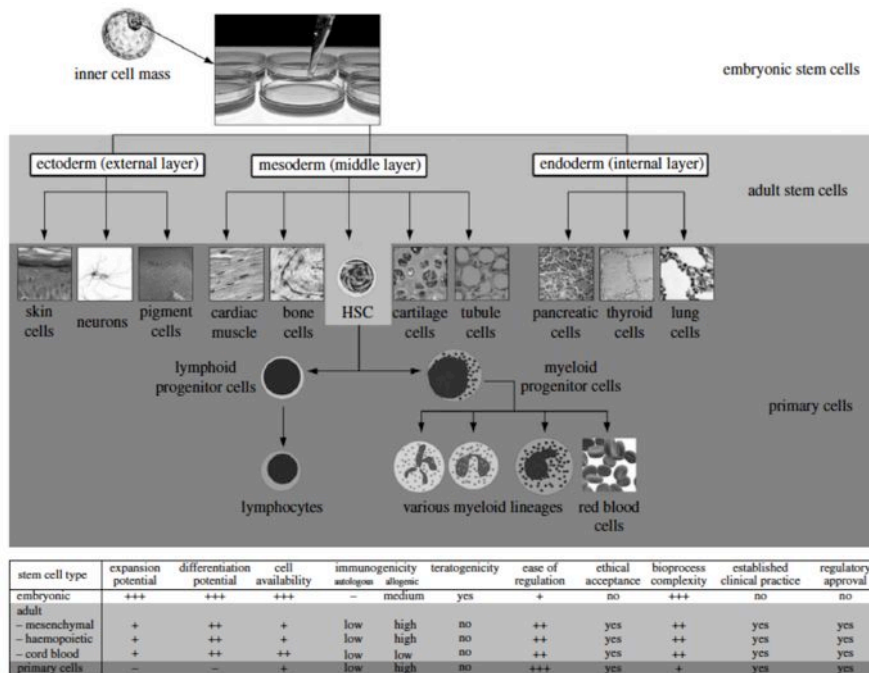


Abbildung 5: Für regenerative Medizin verfügbare Stamm- und Vorläuferzellen Quelle: Cell types available for regenerative medicine applications Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles Mark R. Placzek, I-Ming Chung, Hugo M. Macedo, Siti Ismail, Teresa Mortera Blanco, Mayasari Lim, Jae Min Cha, Iliana Fauzi, Yunyi Kang, David C. L. Yeo, Chi Yip Joan Ma, Julia M. Polak, Nicki Panoskaltis and Athanasios Mantalaris

1.1.5.2 *in vitro* Zellkultur

Als *in vitro* bezeichnet man Vorgänge, die außerhalb eines lebenden Organismus unter laborkontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen stattfinden. Beim Zellwachstum *in vitro* unterscheidet man Isolationskulturen und Expansionskulturen. Die Zielsetzung der Isolationskultur ist das Gewinnen von Zellen aus nativem Gewebe mittels enzymatischen Verdau. Die Zellen werden hierbei mit Hilfe von Enzymen aus dem Bindegewebe des Nativgewebes gelöst und *in vitro* kultiviert.

Bei der Expansionskultur ist die Vermehrung der Zellen das Ziel. Bereits gewonnene Zellen oder Zellgruppen werden unter Idealbedingungen zum vermehrten Wachstum angeregt. Dabei ist die Wachstumsgeschwindigkeit und somit die Zellteilung von eminenter Bedeutung. Dies wird durch

die Versorgung mit Nährmedium und den optimalen Wachstumsbedingungen gewährleistet. Während des Wachstums lassen sich in der Zellkultur mitotische Teilungen beobachten, welche zur zahlenmäßigen Vervielfältigung der Zellen führen. Das sogenannte Passagieren der Zellen wird in der Regel bis zur Feststellung von morphologischen Veränderungen und Verlust der Oberflächenspezifität, z.B. Expression von Rezeptoren, der Zellen durchgeführt. Die so gewonnenen Zellen lassen sich weiter untersuchen oder *in vivo* funktionell einsetzen.

Eine besondere Form der Zellkultur stellt die Hochdichtekultur da. Bei einer Hochdichte-Zellkultur werden aus einer Zellsuspension durch Zentrifugation, Zellpellets erstellt, die mit verschiedenen Induktoren versetzt werden können und somit Vergleiche und Rückschlüsse in Bezug auf die Zusätze ermöglichen. Die Wirkung oder Nicht-Wirkung von Wachstumsfaktoren lassen sie hier besonders gut nachweisen.

Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind aus Aminosäuren aufgebaute, spezialisierte Makroproteine, welche intrazelluläre Prozesse steuern oder extrazellulär Informationen von Zelle zu Zelle weitergeben und somit dem Informationsaustausch der Zellen untereinander und der internen Zellsteuerung dienen. Die Informationsweitergabe erfolgt hierbei über ein Ligand-Rezeptor-System, wobei ein Wachstumsfaktor (Ligand) an einen für ihn spezifischen, zellmembranständigen Rezeptor koppelt und damit einen Signalkaskade in Gang setzt. Je nach Zelle und Ligand werden daraufhin intrazelluläre Prozesse mittels An- bzw. Abschaltung von Genen der Zell-DNA, wie zum Beispiel Wachstum oder Differenzierung, in Gang gesetzt (36).

Unterschieden werden sechs große Wachstumsfaktorenfamilien (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht Wachstumsfaktoren

Familie der Wachstumsfaktoren
<ul style="list-style-type: none">• FGF-Famillie• TGF-Familie• Hedgehodge• Wingless• Delta und Serrate• Ephrine

1.1.5.3 Zellgene

1.1.5.3.1 Haushalts-Gene

Als Haushalts-Gene werden konstitutiv aktivierte Gene bezeichnet, die elementar für den Grundstoffwechsel der Zelle sind und die somit im Gegensatz zu den regulierten Genen stetig exprimiert werden. Ein typischer Vertreter dieser Haushalts-Gene ist die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Das ist ein Protein der Glycolyse, das Phosphatverbindungen aufbaut. Auf Grund der stetigen Expression in allen Zelltypen eignet sich die GAPDH zur Quantifizierung von regulierten Genen und findet Anwendung bei der Durchführung von PCRs (37).

Spezifische Zellgene

Für jede Zellgruppe lassen sich zellspezifisch reguliert exprimierte Gene mittels PCR nachweisen und kategorisieren. Für hyaline Knorpelzellen werden vor allem Aggrekan, COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), HAPLN1 (Hyaluronan and proteoglycan link Protein), sowie Vertreter der Kollagene (Typ I, II, IX) als zelltypisch klassifiziert und eignen sich somit zur Zelltypbestimmung.

Das Strukturprotein Aggrekan macht ca. 10 Prozent des hyalinen Knorpelgewichtes aus und ist zusammen mit den Kollagenen maßgeblich an der Elastizität des Gelenkknorpels auf Grund des hohen Wasseraufnahmevermögens beteiligt.

Kollagene sind ebenfalls typische Strukturproteine der extrazellulären Matrix. Kollagen Typ I kommt gehäuft in nahezu jeder Bindegewebszelle vor. Kollagen Typ II zählt zu den typischen netzbildenden Knorpelprotein und findet sich zu hohen Anteilen in der Matrix von hyalinen Knorpel und bildet zusammen mit ebenfalls häufig assoziierten Typ IX die Grundlage für die hohe Druckelastizität des Knorpels. Kollagen Typ II, Typ IX sind somit spezifisch Proteine des hyalinen Gelenkknorpels.

Ebenfalls zu den häufigen extrazellulären Matrixproteinen gehört das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP). Als Glykoprotein geht es Bindungsaufgaben mit Kollagenen ein und gilt als Marker des Cartilage turnovers, dem Zellersatzverfahrens des Knorpels (36,38,39,40,41).

Knochenzellen hingegen zeichnen sich durch eine hohe Expression von Osteocalcin aus. Dieses aus 49 Aminosäuren bestehende Peptithormon wird von Osteoblasten gebildet und findet sich in den meisten Wirbeltieren. Es zählt zur extrazellulären, nichtkollagenen Matrix und stellt einen Parameter mit hoher Spezifität zur Beurteilung der Knochenneubildung (Osteogenese) dar. Kodiert wird Osteocalcin vom Gen BGLAP und lässt sich mittels Vitamin D3 und Vitamin C induzieren (42).

Fettzellen (Adipozyten) und ihre Vorläuferzellen (Steatoblasten) produzieren neben einer Vielzahl von Hormonen Adipocyt Protein 2 auch fatty acid binding protein 4 (FABP 4) genannt ein Fettsäure-Carrier-Protein, das maßgeblich am transmembranen Fettsäuretransport beteiligt ist. Diese transportierten Fettsäuren binden unter anderem den für Fettzellen typischen, intrazellulären Rezeptor Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ (PPARG). PPARG unterhält, so fern aktiviert, die Differenzierung von Adipozyten und gilt als adipozytenspezifisches Protein (43).

1.1.5.3.2 Oberflächenantigene

Zelladhäsionsmoleküle (CAM) bezeichnen Proteine, die sich auf der Zelloberfläche befinden und eine Rolle bei der Adhäsion mit anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix (ECM) spielen. Diese Proteine sind in der Regel als transmembrane Rezeptoren angelegt und bestehen aus einem intrazellulären Anteil, der Verbindung zum Zytoskelet besitzt. Das ist ein transmembraner Anteil und ein an der Oberfläche befindlichen Anteil, welcher zur Interaktion mit anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix dient.

Man unterteilt Zelladhäsionsmoleküle in vier Super-Familien: Immunglobuline, Integrine, Cadherine und Selektine.

Selektine sind Einzelkettenglykoproteine in der Plasmamembran, die heterophil an Zuckerpolymeren binden und dienen u.a. dem Lymphozyten-Homing, der Rückkehr der Lymphozyten in die Lymphknoten. Bisher sind drei Typen an Selektinen bekannt. E-Selektin findet sich in Endothelzellen, P-Selektin in Thrombozyten und Endothelzellen und L-Selektion in Lymphozyten (44)

Cadherine sind Kalzium abhängige Glykoproteine und spielen eine Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion sowohl als Ligand als auch als Rezeptor sowie bei der Zell- und Gewebewartung und der Zellbewegung. Der Mensch verfügt derzeit über 80 bekannte Cadherine, die sich in vier Hauptgruppen einteilen lassen: klassische, desmosomale, Protocadherine und unkonventionelle Cadherine (45).

Integrine sind ebenfalls transmembrane Rezeptoren und nehmen an der Zell-Zell- und Zell-ECM Interaktion teil und regulieren Zellzyklus (Teilung, Differenzierung, Apoptose) sowie Form und Bewegung der Zelle. Zu den Liganden zählt neben Fibronectin auch Kollagen. Die zwei Hauptfunktionen der Integrine sind zum einem die Verknüpfung der Zelle mit der extrazellulären Matrix und die Signalübermittlung aus der ECM in die Zelle. Zellverknüpfung ist eine der

wichtigsten Bestandteile eines multizellulären Organismus und wird über Tyrosinkinase Rezeptoren vermittelt (46).

Immunglobuline werden auch als Antikörper bezeichnet und besitzen eine Y-förmige Struktur, an deren Ausläufern sich spezifische Antigen-Bindungsstellen (FAB) befinden und an dessen Basis das sogenannte kristallisierbare Fragment (Fc) sitzt. Diese FABs identifizieren Antigene und stimulieren die Bildung weiterer Antikörper und setzen so eine humorale Immunantwort des Körpers in Kraft.

Die Kombination von verschiedenen Immunglobulinen werden als Cluster (CD= cluster of differentiation) bezeichnet und sind spezifisch für einen Zelltyp. Bei der Zelltypisierung kann sich dies zunutze gemacht werden. Hierfür gibt es eigens von Firmen angefertigte Antikörper, welche der Identifizierung und der Lokalisierung von intra- und extrazellulären Proteinen dienen. Unterschiedliche Zellen präsentieren unterschiedliche Kombinationen von Clustern an ihrer Oberfläche und können so mittels fluoreszenzaktiviertem Zellsortierer (FACS) oder immunhistochemischer Färbung anhand ihrer Oberflächenproteine differenziert werden. Westernblot und ELISA stellen weitere Verwendungsmöglichkeiten zur Zellcharakterisierung dar.

„Cluster of differentiation“ bezeichnet eine Ansammlung immunphänotypischer Oberflächenglykoproteine, die spezifisch für jede Zellart exprimiert werden. Für diese Arbeit zeigten sich folgende CDs als wichtig und trugen zur Charakterisierung der Zellen bei:

CD14: Membranprotein, das von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird und an der Bildung des Liposaccharidrezeptors beteiligt ist (Haematopoetische Differenzierung);

CD34: Glykoprotein, das sich typischerweise in Zellen des Knochenmarks findet (haematopoetische Differenzierung);

CD44: Hyaluronsäurerezeptor, der ebenfalls an Kollagene und Laminin bindet und als Homingrezeptor für haematopoetische und mesenchymale Stammzellen fungiert;

CD45: Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ C oder auch Leukocyte common receptor ist ein Transmembranprotein von haematopoetischen Zellen;

CD73: auch als 5'-ribonucleotide Phosphohydrolase bezeichnet, das AMP zu Adenosin konvertiert und als typischer mesenchymaler Marker gewertet wird;

CD90: T-Zellmarker THY-1, der zusammen mit CD34 als Marker für haematopoetische Zellen dient;

CD105: Endoglin ist ein Glykoprotein und Teil des TGF β -Rezeptors und zählt zu den Markern von mesenchymalen Vorläuferzellen;

CD166: gehört zu der Klasse der transmembranen Immunglobuline und wird auch entsprechend des codierenden Gens als ALCAM bezeichnet. Es wird als mesenchymaler Marker gewertet (47-55).

2 Fragestellung

Bei der Behandlung von traumatischen und fokal degenerativen Knorpeldefekten im Kniegelenk wird häufig die Methode der Mikrofrakturierung angewendet (7). Dabei wird der subchondrale Knochen unter der Schadstelle angebohrt, um mesenchymale Stamm- und Vorläuferzellen mit dem Blut einzuspülen, die dann ein (oftmals minderwertiges) Reparaturgewebe ausbilden (56). Zur Unterstützung der chondrogenen Reifung dieser Zellen im Defekt kann zusammen mit der Mikrofrakturierung eine (dreidimensionale) resorbierbare Trägerstruktur verwendet werden, die in den Knorpeldefekt implantiert wird und den einströmenden Stamm- und Vorläuferzellen als Träger- und Leitstruktur dient (7).

Bislang ist jedoch unklar, ob Vorläuferzellen von Patienten mit fortgeschrittener Osteoarthritis das Potential zur chondrogenen Differenzierung und damit zum Aufbau von Knorpelmatrix/Reparaturgewebe in diesen Trägermaterial besitzen.

Ziel der hier vorliegenden Studie ist es, mittels *ex vivo* und *in vitro* Methodik zu untersuchen, ob subchondrale mesenchymale Vorläuferzellen (MPC) von osteoarthrotischen (oa) Spendern aus dem Kniegelenksbereich in der Lage sind, unter Einsatz von Induktoren in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung zu differenzieren. Dazu wurden oaMPC Zellen aus der Spongiosa isoliert, vermehrt, mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung auf zellspezifische Oberflächenantigene charakterisiert und differenziert.

3 Material und Methoden

3.1 Zellgewinnung, Isolierung und Kultivierung

Material

Spinner-Flasche	Wheaton
Primaria [®] Aussaat-Flaschen	Falcon
Collagenase XI	Sigma-Aldrich
Hanks-Salz-Lösung	Biochrom

MPC Medium

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (low glucose 1g/L)	Biochrom
10% Humanserum	Deutsches Rotes Kreuz (DRK)
1% von 10000 U Penizillin/ 10mg/ml Streptomycin	Biochrom
1% von 200mM L-Glutamin	Biochrom
2% von 1M HEPES Puffer	Biochrom
1% von 10mg/ml Gentamicin	Biochrom
100µg/ml Amphotericin	Biochrom
2ng/ml RH FGF basic	Biochrom

Vorgehen

Humane osteoarthrotische subchondrale kortikospongiöse Knochenchips wurden von drei Spendern während der Implantation einer Knieoberflächenersatzprothese gewonnen. Diese waren alle weiblich, zwischen 51 und 62 Jahre alt, 58 Jahre im Mittel, Kellgren Score 3. Die Studie wurde von der Ethikkommission der bayerischen Landesärztekammer genehmigt (Ethik-Kommission Nr. 12045).

Um die humanen im osteoarthrotischen Gelenk gelegenen subchondralen mesenchymalen Vorläuferzellen (oaMPC) zu isolieren, wurden die Knochenchips mittels Skalpell und Luer zerkleinert, mit Hanks-Salz-Lösung gewaschen und bei 37 Grad Celsius für vier Stunden mit 256U/ml Collagenase XI im Kulturmedium teilverdaut. Der Überstand wurde verworfen, die verbliebenen Fragmente in Primaria-Aussaat-Flaschen gegeben und in MPC Medium bei 37 Grad Celsius und 5 Prozent Kohlenstoffdioxid kultiviert. Bei einer erreichten Zellkonfluenz von 80-90% wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA in PBS (1:1, v/v) passagiert und mit einer Dichte von 8000 Zellen/cm² erneut ausgesät. Das Medium wurde alle 2-3 Tage vollständig gewechselt.

3.2 Wachstumskinetik

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik von oaMPC wurden von jedem Spender 1×10^4 Zellen/cm² in T25 Kulturflaschen ausgesät und kultiviert. Nach Zellzahlbestimmung mittels Trypan-Blau-Methode wurden sie erneut mit der Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² ausgesät und bis zur Passage 8 unter Beibehaltung der Bedingungen kultiviert und alle vier Tage passagiert.

Der Wachstumsfaktor jeder Passage wurde dabei wie folgt festgelegt:

$$\text{Wachstumsfaktor der Passage } X = N_{\text{end}} / N_{\text{set}}$$

Formel 1: Berechnung des Wachstumsfaktor. N_{end} : Anzahl der vitalen Zellen am Ende der Passage x; N_{set} : Eingesäte oaMPC zu Beginn der Passage X

Über den Wachstumsfaktor kann nun die Gesamtzellzahl ermittelt werden:

$$\text{Gesamtzellzahl Passage } X = N_{\text{end},x-1} \times pr_x$$

Formel 2: Bestimmung der Gesamtzellzahl

Stellt man die Gesamtzellzahl nun der Passagezeit gegenüber, lässt sich die spezifische Wachstumsrate μ als Exponentialfunktion darstellen:

$$N_x = N_0 \mu^{xt}$$

Formel 3: Darstellung der Wachstumsrate μ als Exponentialfunktion

Die Zeit der Zellzahlverdoppelung t_b und die Populationsverdoppelungsrate n berechnen sich wie folgt:

$$t_b = \ln 2 / \mu$$

Formel 4: Berechnung der Zellzahlverdoppelung

$$n = \log (N_{\text{end}} / N_{\text{start}}) / \log 2$$

Formel 5: Berechnung der Populationsverdoppelungsrate

Zellmigrationsversuch

Material

Humanserum

DRK

Methanol/Aceton (1:1, v/v)

J.T. Baker

ChemoTX Assay System	Neuroprobe
Hemacolor® Staining Kit	Merk

Chemotaxismedium

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (low glucose 1g/l)	Biochrom
0,1% Humanserum	DRK
1% von 10000U Penizillin/ 10mg/ml Streptomycin	Biochrom

Vorgehen

Die Migrationsfähigkeit der oaMPCs (Passage 3) wurde mittels 96 Multi-Well Migrations-Assay (Porengröße 8µm) untersucht. Dafür wurde Humanserum (0,1 Prozent, 5 Prozent und 10 Prozent) in Chemotaxismedium verdünnt und in die untere Vertiefung einer Mikrotiterplatte eingebracht. Die zu untersuchenden oaMPC wurden in Chemotaxismedium aufgenommen und mit einer Zelldichte von 30×10^3 Zellen/Well auf die Membran aufgetragen. Zur Untersuchung der Chemokinese wurden oaMPC (30×10^3 Zellen pro Well) jeweils mit 0,1 Prozent, 5 Prozent und 10 Prozent Humanserum versetzt. Der Migrations-Assay wurde bei 37 Grad Celsius und 5 Prozent Kohlenstoffdioxid für 20 Stunden inkubiert, anschließend wurden nicht migrierte oaMPC von der Membranoberfläche entfernt, die gewanderten oaMPC auf der Membran mit Methanol/Aceton (1:1, v/v) fixiert und mit Hemacolor angefärbt. Abschließend wurden die migrierten Zellen (vier repräsentative Fotos pro Well) ausgezählt und die Anzahl migrierter Zellen pro Well durch Extrapolation berechnet.

3.3 Flowzytometrische Analyse

Material

Bovines Serum Albumin	Roth
C14 (Mouse, Anti-Human, IgG1)-PE	BD Pharmingen
CD34 (Mouse, Anti-Human, IgG1)-PE	BD Pharmingen
CD44 (Mouse, Anti-Human, IgG1)-FITC	BD Pharmingen
CD45 (Mouse, Anti-Human, IgG1)-FITC	BD Pharmingen
CD73 (Mouse, Anti-Human)-PE	BD Pharmingen
CD90 (Mouse, Anti-Human, IgG1)-FITC	BD Pharmingen
CD105 (Mouse, Anti-Human)-FITC	Acris
CD166 (Mouse, Anti-Human, IgG1)-PE	BD Pharmingen
FACS Puffer: PBS + 0,5% BSA	

Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Kühlzentrifuge	Heraeus
FACS Calibur	BD Bioscience

Vorgehen

Die oaMPC ($2,5 \times 10^5$ Zellen, Passage 3) wurden in FACS-Puffer bei 400g für 10 Minuten bei 4 Grad Celsius zentrifugiert, gewaschen und mit fluoreszierendem Phycoerytherin (PE) oder Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten monoklonalen Maus-Anti-human Antikörpern gegen CD14-PE, CD34-PE, CD44-FITC, CD45-FITC, CD73-PE, CD90-FITC, CD105-FITC und CD166-PE resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die markierten oaMPC wurden nach der Inkubation mit Antikörper erneut mit FACS-Puffer gewaschen und bei 400g bei 4 Grad Celsius für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in 500µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Oberflächenzellfärbung wurde mittels Durchflusszytometer (FACS Calibur) und der zugehörigen Software CELLQUEST analysiert. Tote Zellen wurden durch eine Propidiumiodid-Färbung ausgeschlossen. CD34-PE und CD45-FITC gefärbte oaMPC dienen als Isotypenkontrolle.

3.4 Differenzierung

3.4.1 Chondrogene Differenzierung

Material

Transforming growth Faktor $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$)	Peprtech
Dexamethason	Sigma-Aldrich
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich
L-Prolin	Sigma-Aldrich
Insulin-transferrin-natriumselenit (ITS+1)	Sigma-Aldrich

Basismedium

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (high glucose 4,5g/l)	Biochrom
1% von 10000U Penizillin/ 10mg/ml Streptomycin	Biochrom
2% von 1M HEPES Puffer	Biochrom

Kontrollmedium

Basismedium + 0,1µM Dexamethason, 0,35mM L-Prolin, 1% v/v ITS+1
1mM Natriumpyruvat, 0,17mM Arscorbinsäure-2-phosphat

Induktionsmedium

Kontrollmedium + 10ng/ml TGF- β 3

Vorgehen

Die Chondrogene Differenzierung der oaMPC (Passage 3) wurde unter serumfreien Bedingungen in Hochdichte-Pelletkulturen (n=3 Spender, 250000 Zellen/Pellet) durchgeführt. Die Chondrogenese der oaMPC wurde mittels Zugabe von 10ng/ml TGF- β 3 ins Kontrollmedium induziert. Als Kontrolle dienten oaMPC die ausschließlich mit Kontrollmedium kultiviert wurden. Das Nährmedium beider Ansätze wurde alle 2-3 Tage gewechselt und die Zellen für insgesamt 21 Tage kultiviert. An den Tagen 0, 7, 14 und 21 wurden jeweils Probennahmen für histochemische und immunhistologische Untersuchung gewonnen. Für die Untersuchung der Genexpression erfolgten Probennahmen (je Gruppe 20 Pellets) an den Tagen 0 und 14.

3.4.2 Osteogene Differenzierung

Material

Dexamethason	Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich
β -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich

Kontrollmedium

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (low glucose 1g/l)	Biochrom
1% von 10000U Penizillin/ 10mg/ml Streptomycin	Biochrom
10% Humanserum	DRK
2% von 1M HEPES Puffer	Biochrom
1% von 200mM L-Glutamin	

Induktionsmedium

Kontrollmedium + 0,01 μ M Dexamethason, 0,05mM Ascorbinsäure-2-phosphat, 10mM β -Glycerolphosphat

Vorgehen

Für die osteogene Differenzierung wurden oaMPC jeweils mit einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/cm² in einer 6-Well-Platte eingesät und kultiviert. Zur osteogenen Differenzierung wurden

konfluente Monolayerkulturen mit Induktionsmedium stimuliert. Als Kontrolle dienten oaMPC, die ausschließlich mit Kontrollmedium kultiviert wurden. Die Zellen wurden für 28 Tage in Kultur gebracht und das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

3.4.3 Adipogene Differenzierung

Material

Dexamethason	Sigma-Aldrich
Indomethacin	Sigma-Aldrich
3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich
Insulin	Novo Nordisk

Kontrollmedium

Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (high glucose 4,5g/l)	Biochrom
1% von 10000U Penizillin/ 10mg/ml Streptomycin	Biochrom
10% Humanserum	DRK2% von 1M HEPES Puffer Biochrom

Induktionsmedium

Kontrollmedium + 1µM Dexamethason, 0,2mM Indomethacin, 0,5mM IBMX, 0,01mg/ml Insulin

6-Well Platte	Becton Dickinson
---------------	------------------

Vorgehen

Zur adipogenen Differenzierung wurden oaMPC in 6-Well-Platten (1×10^4 Zellen/cm²) ausgesät. Zur Induktion der Adipogenese wurden die oaMPC über 21 Tage mit Induktionsmedium kultiviert. Als Kontrolle dienten kultivierte Zellen ohne adipogene Stimulierung.

3.5 Histologische, histochemische und immunhistochemische Analyse

Zum Nachweis chondrogener Differenzierung wurden die Pelletkulturen in ein TissueTek Medium eingebracht, in flüssigem Stickstoff gefroren und mittels Mikrotom bei einer Schnittdicke von 6µm geschnitten. Diese Kryoschnitte wurden immunhistochemisch mit primären Kollagen Typ II Antikörper für 30 Minuten inkubiert, kolorimetrisch mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (EnVision++ und HRP-System) detektiert und mit Hematoxylin gegengefärbt. Proteoglykane wurden mit Alcianblau 8GX bei pH 2,5 und Glykosaminoglykane mittels Safranin O-Färbung nachgewiesen.

In osteogen induzierten oaMPC wurden durch von Kossa-Färbung mineralische Anteile in der ECM nachgewiesen.

Zum Nachweis der adipogenen Differenzierung von oaMPC wurden Lipidvakuolen mittels Oil Red O Färbung sichtbar gemacht.

Immunhistochemische Färbung Kollagen Typ II

Material

Feuchtekammer

Rabbit anti-human Antikörper gegen Kollagen Typ II

Acris

Methanol/Aceton (1:1, v/v)

J.T. Baker

0,037mol/l Ammoniaklösung

J.T. Baker

Aquatex[®]

Merck

EnVision++

Dako

3-Amino-9-Ethylcarbazol (ACE) – Substrat Chromogen

Antikörperverdünnung

Peroxidase molekülgekoppelter Sekundärantikörper

Hematoxylin

0,03% Hydrogenperoxid

Vorgehen

Die bei Raumtemperatur getrockneten Schnitte werden in eisgekühltem Methanol/Aceton Gemisch für fünf Minuten fixiert und die Peroxidasereaktion durch Hydrogenperoxid (15 Minuten) blockiert. Nach einem Spülschritt werden die Proben mit dem Primärantikörper für 40 Minuten bei 37 Grad Celsius in der Feuchtekammer inkubiert. Um eine Überladung der Schnitte mit Antikörpern zu verhindern, wurde zuvor die richtige Antikörperkonzentration in Verdünnungen 1:200, 1:400 und 1:800 ausprobiert. Eine Negativkontrolle erfolgte mit Fc-Fragmenten der Rabbit-IgG Fraktion mit Umkehr der Antikörper. Der Primärantikörper wurde mit PBS ausgewaschen und die Schnitte mit dem Sekundärantikörper für 40 Minuten bei 37 Grad Celsius in der Feuchtekammer inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift. Danach wurden die Proben mit ACE-Chromogen für weitere zehn Minuten inkubiert, dann mit destilliertem Wasser gespült, mit Hematoxylin drei Minuten lang gegengefärbt, erneut gespült und in Ammoniaklösung gebläut. Abschließend folgte die Einbettung mit Aquatex.

Alcianblau Färbung

Material

99-100% Essigsäure	J.T. Baker
100% Ethanol	Merck
Alcianblau 8GX Lösung	Sigma-Aldrich
Kernechtrot Lösung (5% Aluminiumsulfat)	Carl Roth GmbH + Co.KG
RotiHistol®	Carl Roth GmbH + Co.KG
Vitro-Clud®	R. Langenbrick

Vorgehen

Alcianblau ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff. Die undifferenzierte Methode ermöglichte den Nachweis saurer Mukosubstanzen ohne Unterscheidung von Karboxyl- und Sulfatgruppen. Saure Mukosubstanzen treten dabei leuchtend blau hervor, Zellkerne werden von Alcianblau nicht angefärbt und werden daher mit Aluminiumsulfat gegengefärbt (rot).

Das Einstellen der Schnitte auf einen pH 2,5 erfolgte in dreiprozentiger Essigsäure für drei Minuten. Zur Färbung wurde 1 Prozent Alcianblau-Lösung, pH-Wert 2,5, für 30 Minuten eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen, zuerst in dreiprozentiger Essigsäure und dann in destilliertem Wasser, wurde die Gegenfärbung mit Kernechtrot für drei bis fünf Minuten durchgeführt. Darauf folgten Entwässerungsschritte in Alkohol 96 Prozent und 100 Prozent und RotiHistol für fünf Minuten. Abschließend wurden die gefärbten Pelletkulturen in Vitro-Clud eingebettet. Es erfolgte eine Semiquantifizierung der gebildeten Proteoglykane mittels Adobe Photoshop CS3 Software. Dafür wurde anhand der Positivkontrolle eine bestimmte Standardfarbe definiert, welche die positive Färbung repräsentiert (hier blau für Alcianblau). Anschließend erfolgte eine Bestimmung der Bildpixel (positive Pixel) für die definierte Farbe sowie eine Bestimmung der Gesamtbildpixel des Pellets. Daraus lässt sich dann der prozentuale Anteil an gefärbten Proteoglykanen eines jeden Pellets bestimmen.

$$\text{Färbungsgrad} = (\text{positive Pixel} \times 100) / \text{Gesamtpixel} \text{ in } \%$$

Formel 6: Berechnung des Proteoglykananteils in Prozent

Safranin O Färbung

Material

99-100% Essigsäure	J.T. Baker
100% Ethanol	Merck

0,7% Safranin O Lösung	Sigma-Aldrich
0,2% Fastgreen Lösung	Sigma-Aldrich
100% Isopropanol	Merck
RotiHistol®	Carl Roth GmbH + Co.KG
Vitro-Clud®	R. Langenbrick

Vorgehen

Mit Safranin O werden sulfatierte Proteoglykane rot angefärbt, mit der Gegenfärbung Fastgreen erscheinen extrazelluläre Bestandteile grün. Die Schnitte werden zunächst in 92 Prozent Ethanol gewaschen und anschließend mit 0,7 Prozent Safranin O Lösung für 30 Minuten gefärbt. Nach dem spülen mit Wasser folgte die Gegenfärbung mit 0,2 Prozent Fastgreen Lösung für eine Minute. Überschüssige Färbelösung wurde abgespült und die Schnitte entwässert (96 Prozent und 100 Prozent Isopropanol sowie RotiHistol) und in Vitro-Clud eingebettet.

Oil Red O-Färbung

Material

Oil Red O	Sigma-Aldrich
99% 2-Isopropanol	Merck

Vorgehen

Die oaMPC in der 6-Well Platte wurden mit PBS gewaschen und mit Oil Red O-Lösung (0,5g Oil Red O in 100ml 99 Prozent 2-Isopropanol) bedeckt. Nach 30 Minuten Inkubation in absoluter Dunkelheit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und sofort Fotodokumentiert.

Von Kossa Färbung

Material

Methanol	J.T. Baker
Silbernitrat	Sigma-Aldrich
Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich
25-40% Formaldehyd	Sigma-Aldrich

Färbelösung

5g Silbernitrat / 100ml destilliertes Wasser

Entwicklerlösung

5g Natriumbikarbonat in 25ml Formaldehyd mit destillierten Wasser auf 100ml aufgefüllt

Vorgehen

Die in 6-Well Platten kultivierten oaMPC wurden mit eisgekühlten Methanol fixiert und nach 30 Minuten mit Aqua dest gespült. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1,5ml 5 Prozent Silbernitratlösung bei Dunkelheit für 30 Minuten inkubiert und anschließend mehrfach gespült. Es folgte eine Inkubation mit der Entwicklerlösung für 10 Minuten im Dunklen und anschließender erneuter Spülung mit destillierten Wasser. Die Fotodokumentation erfolgte sofort im Anschluss.

3.6 Genexpressionsanalyse

Material

TriReagent	Sigma-Aldrich
1-bromo-3-chloropropan	Sigma-Aldrich
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen
iScript cDNA Synthese Kit	BioRad
i-Cycler PCR System	BioRad
SYBR Green PCR Core Kit	Applied Biosystems Inc

Vorgehen

Die Gesamt-RNA wurde aus 20 Hochdichtezellpellets gewonnen. Nichtinduzierte Proben wurden an Tag 0 und 14 geerntet. Induzierte Zellpellets wurden nur am 14. Tag geerntet. Die Gesamt-RNA (1µg je Probe) wurden mit iScript cDNS Synthese Kit nach Herstellerangaben transkribiert. Das relative Expressionslevel des Haushalts-Genes Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurde zur Normierung der Markergene genutzt (Abbildung 6). Die Real-Time rt-PCR wurde mittels i-Cycler PCR System mit 1µl jeder Probe cDNS mit SYBR Green PCR Core Kit in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die relative Quantifizierung der Markergene wurde entsprechend der $\Delta\Delta$ -Ct Methode durchgeführt und die Ergebnisse als Quotient aus Menge an Zielgenkopien und Menge an GAPDH-Kopien dargestellt. Abschließend

erfolgte die relative Quantifizierung der Genexpressionslevel in Bezug auf das Haushalts-Gen GAPDH.

Tabelle 4: Oligonukleotide die bei der Real Time rt-PCR verwendet wurden

Gen-Name	Gen Symbol	Accessionnummer	Oligonucleotide upper Sequence	Oligonucleotide lower Sequence	Produktgröße (Basenpaare)	Annealing Temperatur in °C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	NM_002046.3	GCGGATGCTGGCGCTGAGTAC	TGGTCCACACCCATGACGA	149	62
Aggrecan	AGC1	NM_001135	GGCTGCTGTCCCGTAGAAGA	GGGAGGCCAAGTAGGAAGGAT	163	58
Cartilage link protein	HAPLN1	NM_001884.2	GCGTCCGCTACCCATCTCTA	GCGCTCTAAGGGCACATTCAGTT	145	56,6
Cartilage oligomeric matrix protein	COMP	NM_000095	CCGGAGGGTGACGCGCAGATTGA	TGCCCTCGAAGTCCACGCCATTGAA	133	62
Fatty acid binding protein 4	FABP4	NM_001442	CCTTAGATGGGGGTCTCTGGTA	AACGTCCTTGGCTTATGCTCTC	156	62
Osteocalcin	BGLAP	NM_199173	GAGCCCCAGTCCCTACCC	GCCTCTGAAAGCCGATGTG	103	58
Type Iα1 collagen	COL1A1	NM_000088.2	CGATGGCTGCACGAGTCACAC	CAGGTTGGGATGGAGGGAGTTTAC	180	62
Type IIα1 collagen	COL2A1	NM_001844	CCGGGCAGAGGGCAATAGCAGGTT	CAATGATGGGGAGGCGTGAG	128	62
Type IXα3 collagen	COL9A3	NM_001853.2	AATCAGGCTCTCGAAGCTCATAAAA	CCTGCCACACCCCGCTCCTTCAT	100	55,1
Type IXα3 collagen	COL10A1	NM_000493.2	GAACCCAGCAGCAGAATCC	GTGTTGGGTAGTGGCCCTTTATG	145	55

Statistische Analyse

Die Daten wurden mit SigmaStat 3.5 (Systat Software, Germany) statistisch ausgewertet. Zur Bestimmung von Signifikantenänderungen wurden die Daten auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov Test überprüft. Anschließend wurde der Student's t-Test oder der nicht parametrische Mann-Whitney-Rank-Test (U-Test) für den Vergleich von zwei Gruppen durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant eingestuft, wenn $p \leq 0,01$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie und Wachstumskinetik

Die osteoarthrotischen subchondralen cortico-spongiösen Knochenfragmente, aus denen die oaMPC gewonnen wurden, maßen 15x10mm in ihrer Größe. Zwischen dem vierten und zehnten Tag nach Kultivierung begannen die ersten Zellen aus den Knochenfragmenten auszuwachsen (Auswachskultur). Diese Zellen waren dabei fest an die Oberfläche angeheftet und zeigten eine spindelförmige, fibroblastenartige Morphologie. Sie waren agranulär und formten Zellkolonien. Die subkultivierten oaMPC wuchsen einzellschichtig (Monolayer) und zeigten weiterhin eine fibroblastenartige Morphologie ohne Zeichen von Granulation (Abbildung 7A). Beim Erreichen einer Konfluenz von 90% zeigte sich ein wirbelartiges Wachstumsmuster (Abbildung 6B). Zur Beurteilung des Wachstumsverhaltens wurde eine Wachstumskinetik durchgeführt. Dazu wurden die oaMPC über acht Passagen unter gleichbleibenden Bedingungen kultiviert ($2,5 \times 10^5$ Zellen / T25 Kulturflasche für vier Tage). Interpoliert man die Gesamtzellzahl mit der Zeitdauer der Kultivierung, erhält man die spezifische Wachstumsrate μ der Zellen, welche sich als Exponentialfunktion darstellt. Im Schnitt betrug die Wachstumsrate μ $0,204 \pm 0.015 \text{ Tage}^{-1}$ (Abbildung 7). Die Zeitspanne zur Populationsverdoppelung t_b lag bei 3,67-3.99 Tagen. In Summa betrug die Verdoppelungsrate n $8,09 \pm 0.57$ Verdoppelungen bei einer Erstaussaat von $2,5 \times 10^5$ Zellen.

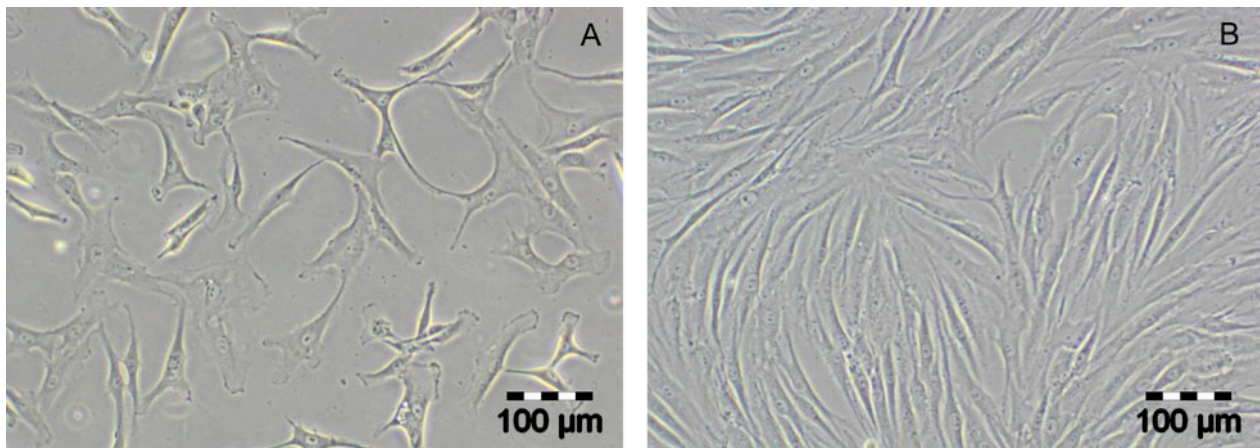


Abbildung 6: Die oaMPC zeigen ein spindelförmiges Erscheinungsbild (A) mit einem wirbelartigen Muster (B)

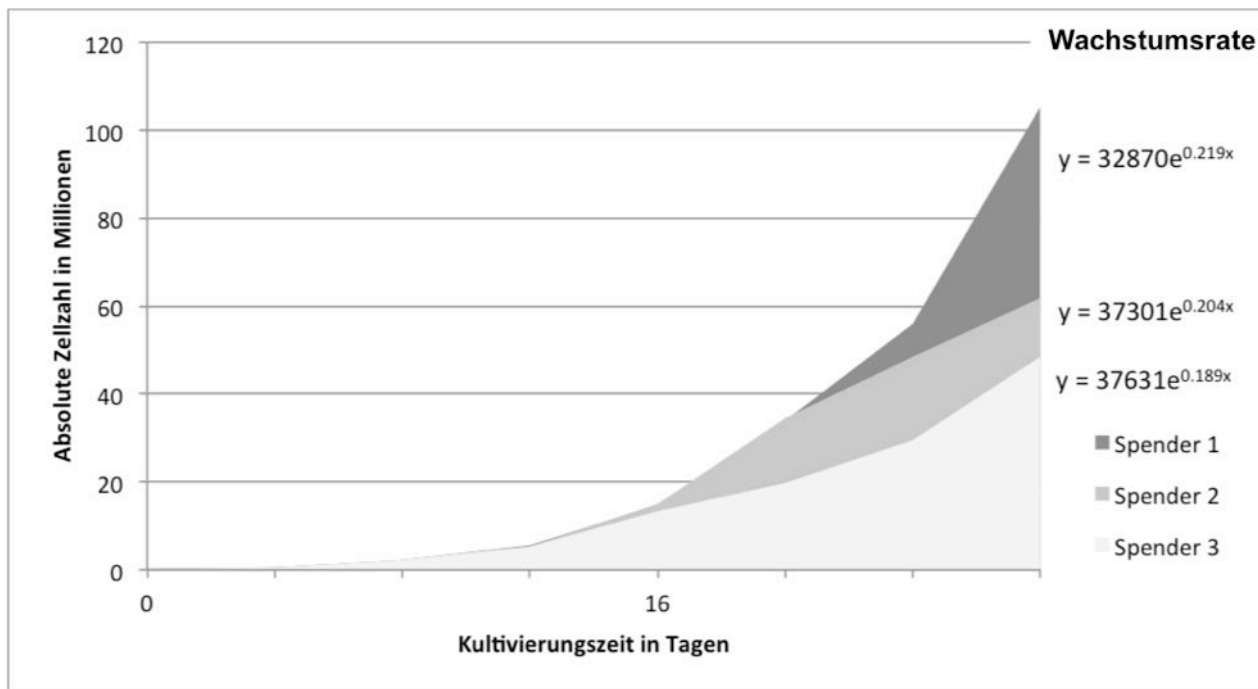


Abbildung 7: Diagramm der absoluten Zellzahl im Verhältnis zur Kultivierungszeit zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ ; die durchschnittliche Wachstumsrate lag bei $0,204 \pm 0,015$ pro Tag

4.2 Zelloberflächenantigene

Während der Expansion exprimierten die oaMPC die für mesenchymale Stamm- und Vorläuferzellen bekannten typischen Oberflächenantigene. Die oaMPC zeigten sich im Mittel dabei als homogene Zellpopulation und zeigten entsprechend der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie die Antigene Hyalinsäurerezeptor (CD44; $99,9\% \pm 0,1\%$), SH-3 (CD73, 5'-ribonucleotide phosphohydrolase; $99,8\% \pm 0,2\%$), THY-1 (CD90; $99,9\% \pm 0,1\%$), SH-2 (CD105, Endoglin; $90,3\% \pm 4,5\%$) und das aktivierte Leukozyten-Zell-Adhäsionsmolekül (CD116, ALCAM; $99,7\% \pm 0,3\%$).

Cluster die zur hämatopoetischen Zelllinie zählen, konnten gar nicht nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten sich negativ für den Liposaccharid Rezeptor CD14 (0,02% positive Zellen), das hämatopoetische Antigen CD34 (0,01% positive Zellen) sowie für das Leukozyten spezifische Antigen CD45 (0,23% positive Zellen) (Abbildung 9).

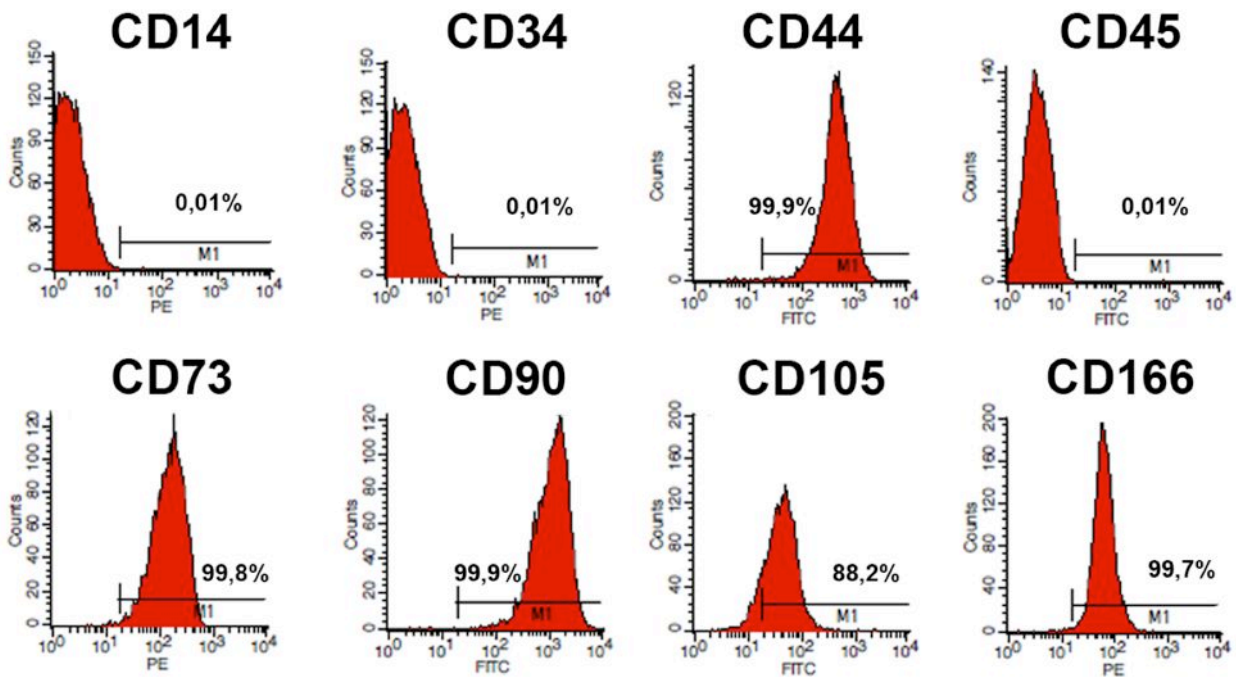


Abbildung 8: Die flowzytometrische Auswertung von Zelloberflächenantigenen exemplarisch von einem Spender. Die oaMPC zeigen sich positiv für die Antigene CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166 sowie negativ für CD14, CD34 und CD45

4.3 Chemotaxis und Zellmigration

Zur Bestimmung der Fähigkeit zur Zellmigration wurden chemotaktische Versuche durchgeführt. Ein Augenmerk liegt dabei auf dem Unterschied zwischen spontaner Zellbewegung, auch Chemokinese genannt, und der gerichteten Zellmigration (Chemotaxis). Gewanderte Zellen wurden mit Hemacolor angefärbt und dokumentiert (Abbildung 9).

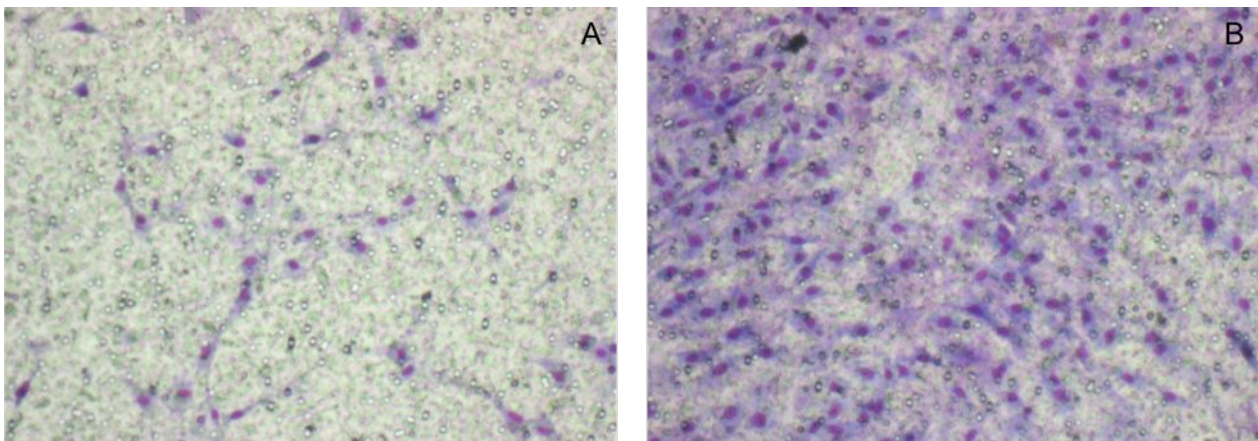


Abbildung 9: Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden wandern oaMPC durch die Poren (A) und können nach der Färbung (B) ausgezählt werden

Die Ergebnisse der Chemotaxis wurden um die Anzahl der Chemokinese korrigiert.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Anstieg ($p < 0,01$) an spontan gewanderten oaMPC, welche mit fünf Prozent (8670 Zellen im Mittel) und zehn Prozent (8977 Zellen im Mittel) Humanserum stimuliert wurden, gegenüber oaMPC, die mit 0,1% (2266 Zellen im Mittel) Serum stimuliert wurden. Weiterhin konnte kein statistischer Unterschied zwischen oaMPC, die mit fünf Prozent oder zehn Prozent Humanserum stimuliert wurden, gefunden werden (Abbildung 11). Nach Subtraktion der Chemokinese zeigte sich, dass sowohl fünf Prozent (3518 Zellen im Mittel) als auch zehn Prozent (2749 Zellen im Mittel) Humanserum die oaMPC zur chemotaktischen Migration angeregt. Dabei regt fünf Prozent Serum etwa $40\% \pm 5\%$ der gewanderten Zellen zur chemotaktischen Migration an. Bei zehn Prozent Humanserum sind es hingegen nur $30\% \pm 4\%$ der Zellen (Abbildung 12).

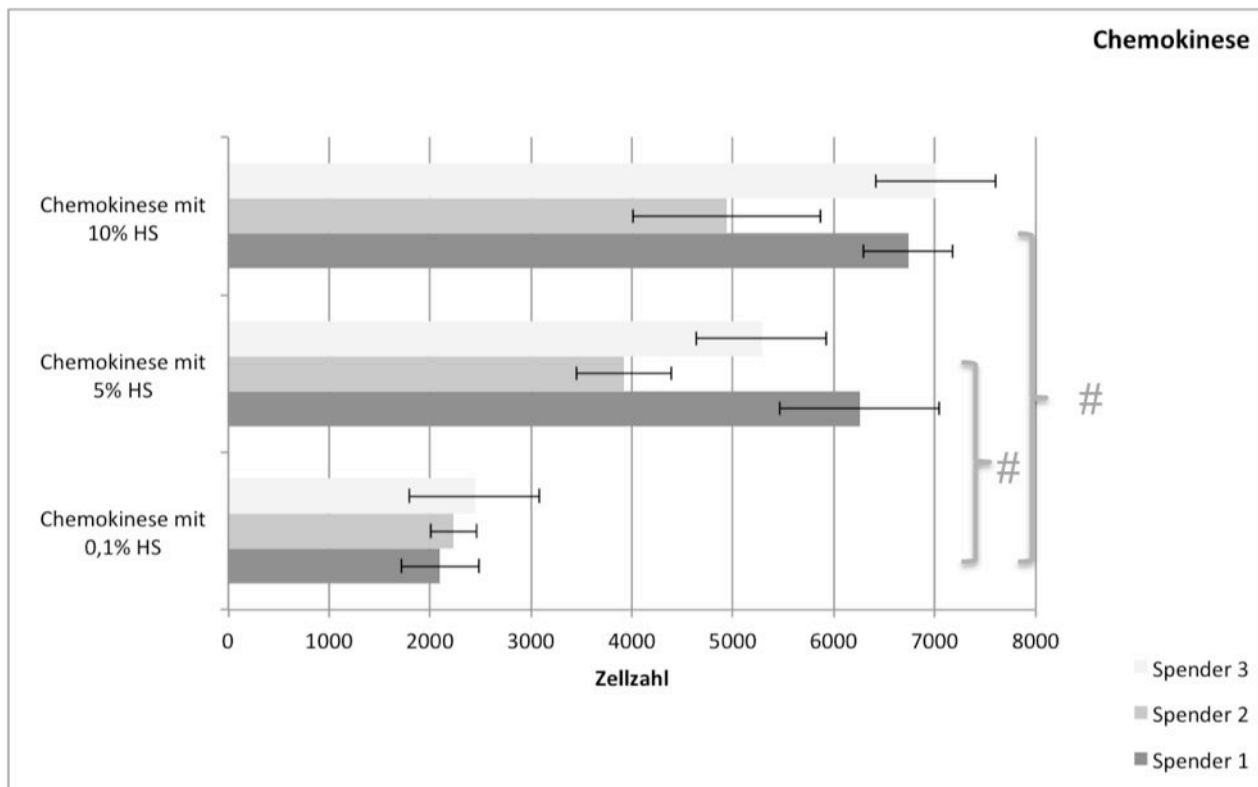


Abbildung 10: Im Vergleich zu oaMPC, die mit 0,1% Humanserum stimuliert wurden, zeigen oaMPC, die mit 5% oder 10% Serum stimuliert wurden, eine statistisch signifikante Erhöhung ($\#p < 0,01$)

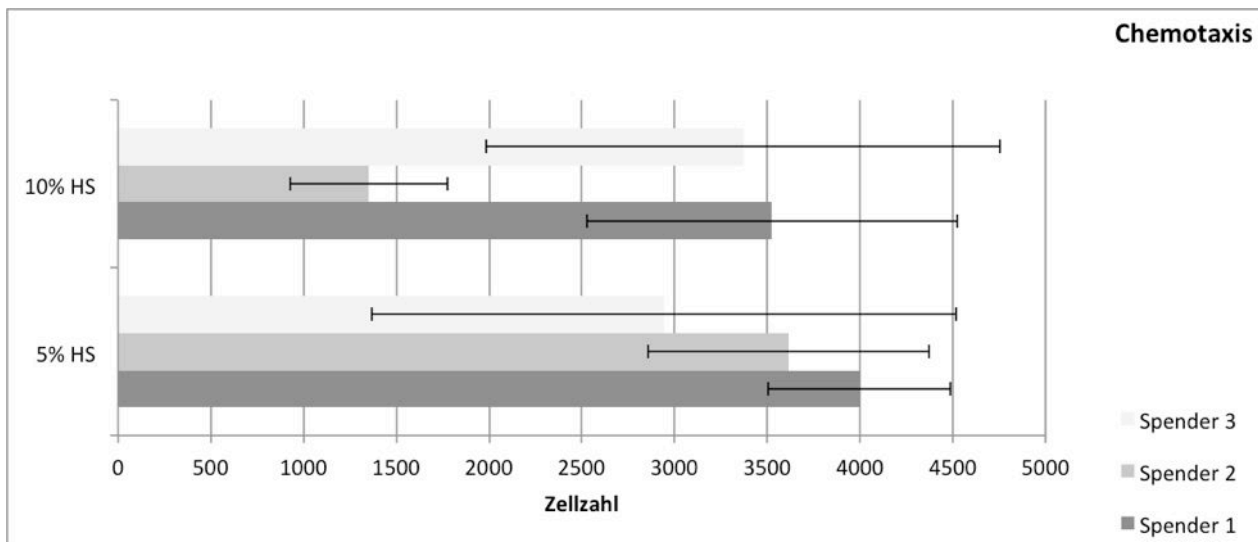


Abbildung 11: Die mesenchymalen Vorläuferzellen zeigten nach Induktion mit 5% und 10% Humanserum chemotaktische Aktivität

4.4 Chondrogene Differenzierung

Zur Bewertung des chondrogenen Differenzierungspotentials von osteoarthrotischen humanen mesenchymalen Vorläuferzellen, wurden die Zellen für 21 Tage in hochdichten Pelletkulturen kultiviert und mittels TGF- β 3 in die chondrogene Richtung stimuliert. Die histologische Aufbereitung und Analyse der Hochdichtepelletkulturen an Tag 0, 7, 14 und 21 zeigte, dass die oaMPC eine dichte zelluläre Matrix exprimierten, die reich an Proteoglykanen war. Die so gewonnenen Zellpellets wurden unter anderem mit Safranin O gefärbt. Als Positivkontrolle diente ebenfalls mit Safranin O gefärbter nativer hyaliner Knorpel (Abbildung 12).

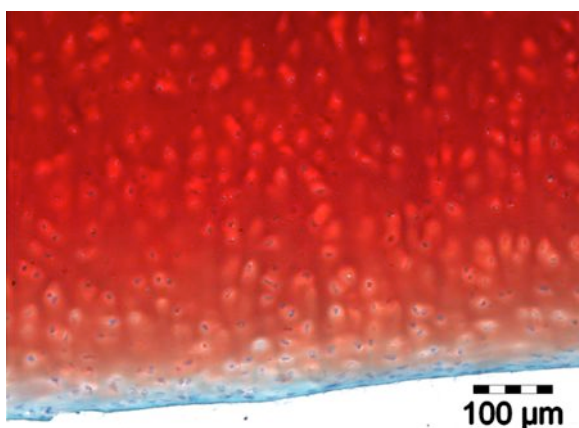


Abbildung 12: Safranin O gefärbter nativer hyaliner Knorpel als Positivkontrolle. Proteoglykane in rot, Zellkerne in grün dargestellt

Die Gegenfärbung erfolgte mit Fastgreen. Proteoglykane stellten sich rot dar, Zellkerne und Bindegewebe wurden grün angefärbt. Die induzierten Zellpellets zeigten eine gleichmäßig über das Pellet verteilte Rotfärbung der Proteoglykane in der Matrix (Abbildung 13).

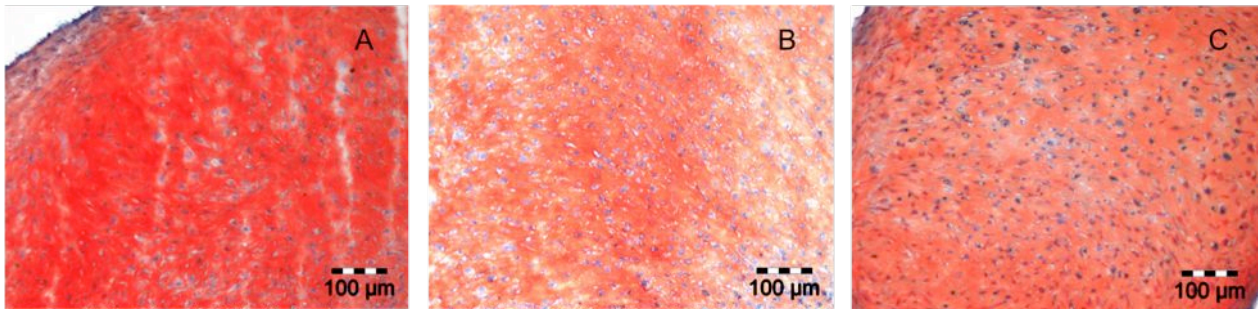


Abbildung 13: Safranin O gefärbte Histologieschnitte von induzierten oaMPC am Tag 21 mit ausgeprägter Rotfärbung der Proteoglykane. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

Die nicht induzierten Kontrollschnitte zeigten eine fast durchgängige bläulich-grünliche Färbung mit nur geringen roten Farbinseln, als Hinweis für geringe bis fehlende Proteoglykansynthese (Abbildung 14).

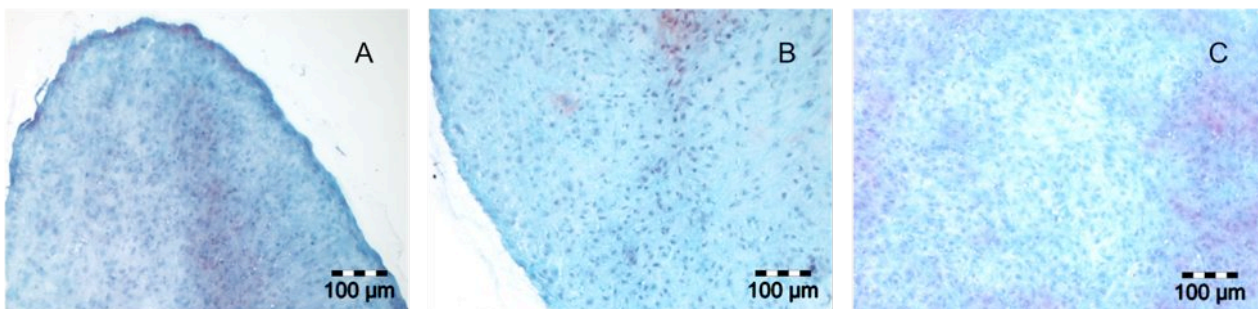


Abbildung 14: Nicht induzierte oaMPC am Tag 21. Färbung Safranin O mit geringen Proteoglykannachweis. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

Parallel dazu wurden histologische Schnitte an den entsprechenden Tagen mit Alcianblau gefärbt. Hier zeigten sich saure Proteoglykane wie Aggrekan bläulich, die Zellkerne erscheinen nach Gegenfärbung mit Kernechtrot Lösung rötlich-lila. Als Positivkontrolle diente ein ebenfalls mit Alcianblau gefärbter nativer hyaliner Knorpel (Abbildung 15).

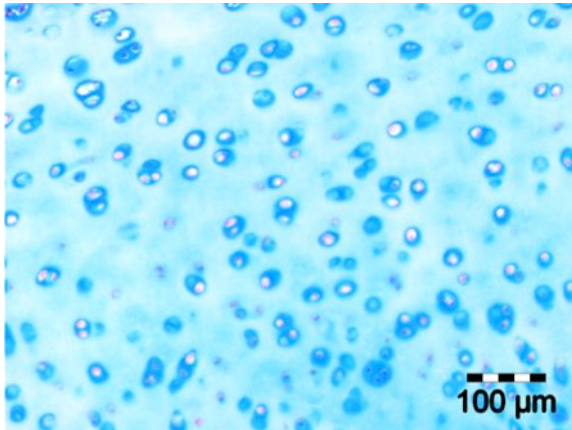


Abbildung 15: Alcianblau gefärbter nativer hyaliner Knorpel als Positivkontrolle. Proteoglykane in blau, Zellkerne in rötlich-lila dargestellt

Sowohl induzierte als auch nicht induzierte Pellets zeigten eine Zunahme der Blaufärbung im Bereich der extrazellulären Matrix und somit eine Synthese von Proteoglykanen.

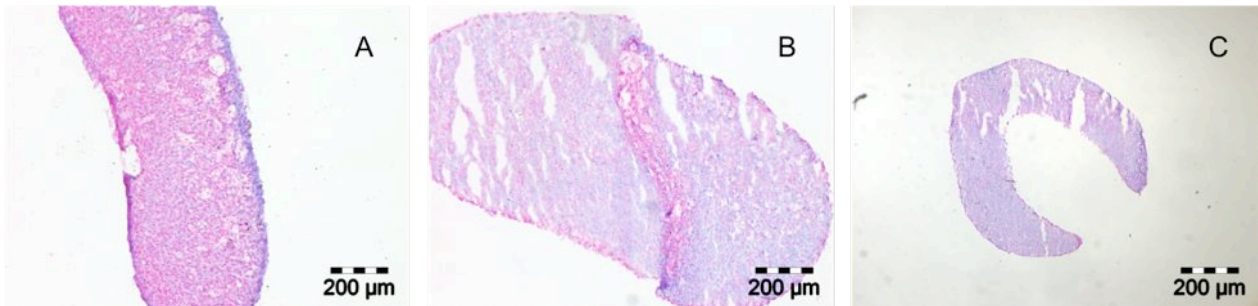


Abbildung 16: Alcianblau gefärbte Kryoschnitte von Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C) am Tag 0 der Kultivierung

Unterschiede zeigten sich jedoch in der Intensität und Lokalisation der Färbung. Bis zu Tag 7 zeigten sich bei den nicht induzierten Pellets histologisch keine Unterschiede in der Zellfärbung (Abbildung 16, Abbildung 17).

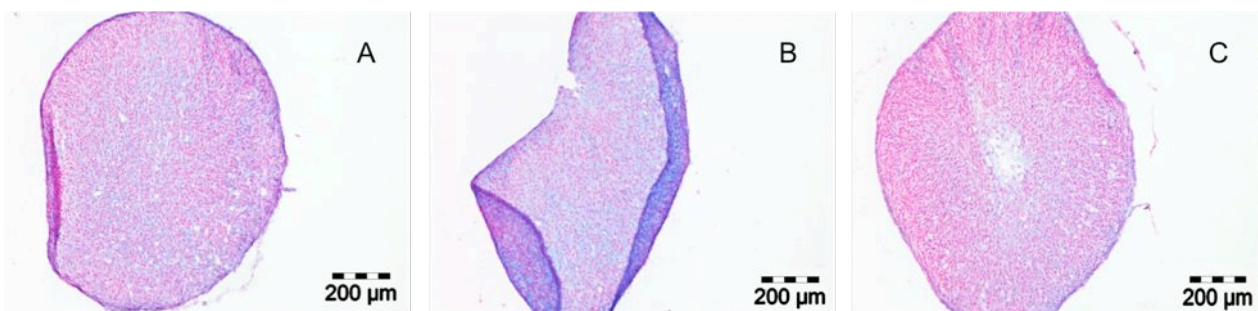


Abbildung 17: Alcianblau gefärbte Kryoschnitte am Tag 7 bei nicht induzierten oaMPC. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

Bei den chondrogen induzierten oaMPC konnte bereits ab Tag 7 eine Zunahme von Proteoglykanen nachgewiesen werden (Abbildung 18).



Abbildung 18: Alcianblau Färbung von induzierten oaMPC am Tag 7. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

Eine weitere Zunahme an Proteoglykansynthese konnte in chondrogen induzierten oaMPC an Tag 14 beobachtet werden (Abbildung 19).



Abbildung 19: TGF-β3 induzierte Zellen zeigten in den Alcianblau-Schnitten von Tag 7 auf Tag 14 einen starken Anstieg an Proteoglykanen. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

Am Tag 21 zeigte die chondrogen induzierten oaMPC eine Vergleichbare intensive Färbung der Proteoglykane verglichen zu Tag 14 (Abbildung 20).

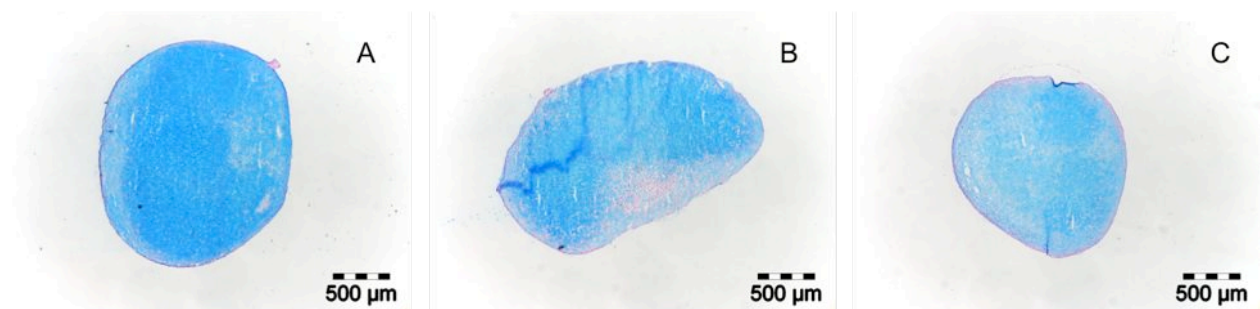


Abbildung 20: Tag 21 der chondrogen induzierten oaMPC nach Alcianblau Färbung. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

Im Gegensatz dazu zeigten die nicht chondrogen induzierten oaMPC nur eine sehr geringe Zunahme an Proteoglykanen, welche weit weniger ausgeprägt war, gegenüber den chondrogen induzierten oaMPC (Abbildung 21).

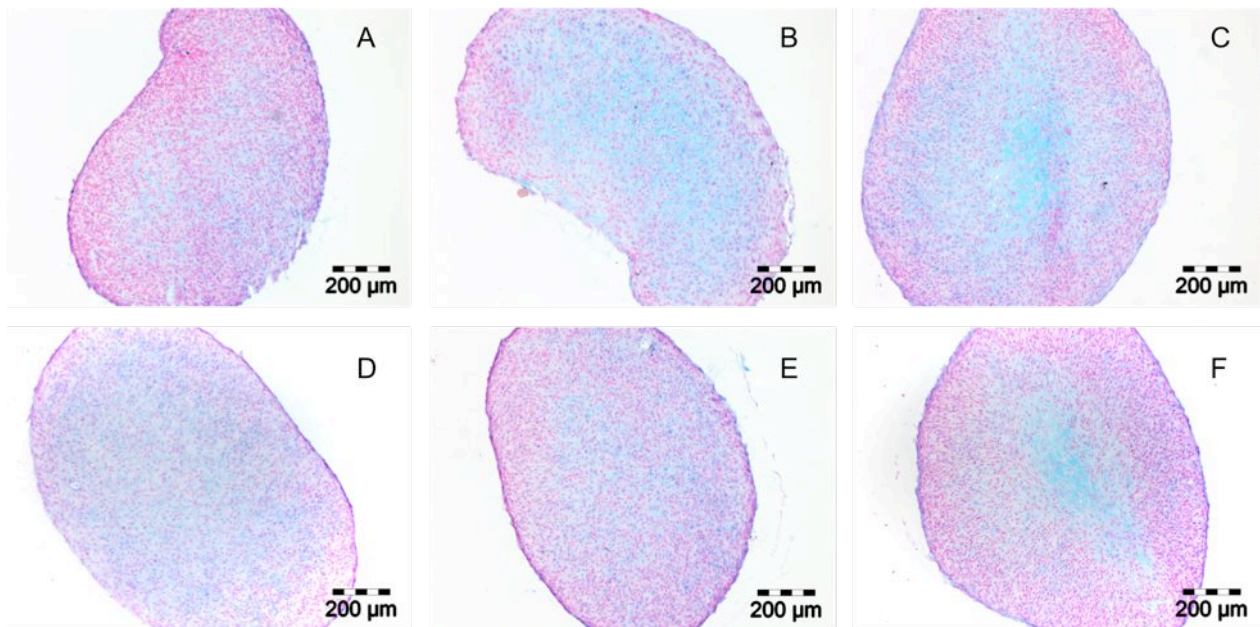


Abbildung 21: Alcianblau Färbung der Kryoschnitte von nicht induzierten oaMPC an Tag 14. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C) und an Tag 21 (Spender 1(D), Spender 2 (E), Spender 3 (F))

Zur Validierung der optischen Ergebnisse wurden die Schnitte fotografiert und mit Adobe Photoshop Software CS3 ausgewertet. Die als positiv gezählten Pixel (Alcianblau angefärbt) wurden zur Gesamtpixelzahl des Pellets ins Verhältnis gesetzt. So ergab sich der Färbegrad als Prozentsatz von Positivpixel zur Gesamtzahl der Pixel. Somit kann eine semi-quantitative Analyse der gebildeten Proteoglykane für jeden Spender pro Pellet erfolgen und ausgewertet werden. Sowohl Die TGF- β 3 induzierten Zellpellets als auch die nicht induzierten oaMPC-Zellpellets zeigten am Tag 7, 14 und 21 eine signifikant ($\#p < 0,01$) höhere Proteoglykanbildung gegenüber den Pelletkulturen an Tag 0. Innerhalb der TGF- β 3 Gruppe zeigte sich eine Proteoglykanzunahme von Tag 7 (42,0%) zu Tag 21 (74,3%). Dabei zeigen induzierte oaMPC Pelletkulturen eine signifikante ($*p < 0,01$) Proteoglykanzunahme gegenüber den nicht induzierten Pelletkulturen an den jeweils korrespondierenden Tagen. (Abbildung 22).

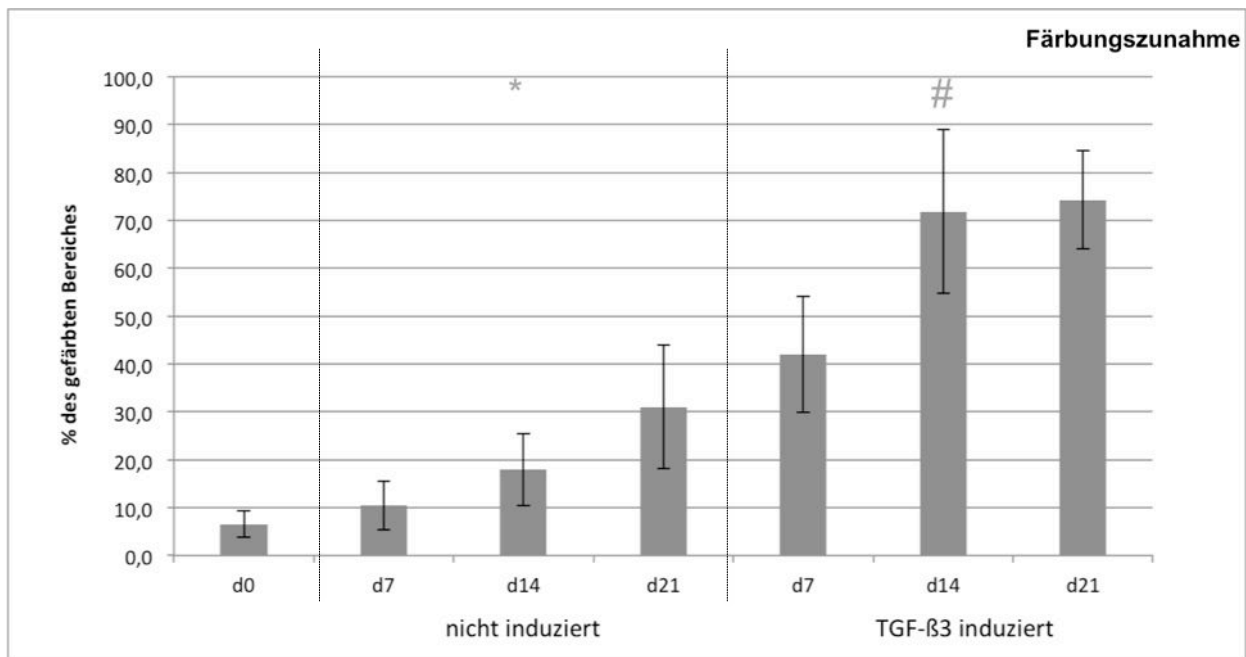


Abbildung 22: Verhältnis von positiv gefärbten Pixeln zur Gesamtpixelzahl in Prozent. Alle induzierten Schnitte zeigten einen signifikanten Anstieg zu Tag 0 ($p \# < 0,01$) und zu den nicht-induzierten Zellen ($p^* < 0,01$)

Als technische Kontrolle der Kollagen-Typ II-Antikörperfärbung diente eine Rabbit IgG-Fraktion, damit einerseits eine unspezifische Bindung des Fc-Teils des Primärantikörpers und andererseits eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 23 A). Als Positivkontrolle diente der mit Kollagen Typ II Antikörperfärbung gefärbte native hyaline Knorpel (Abbildung 23 B).

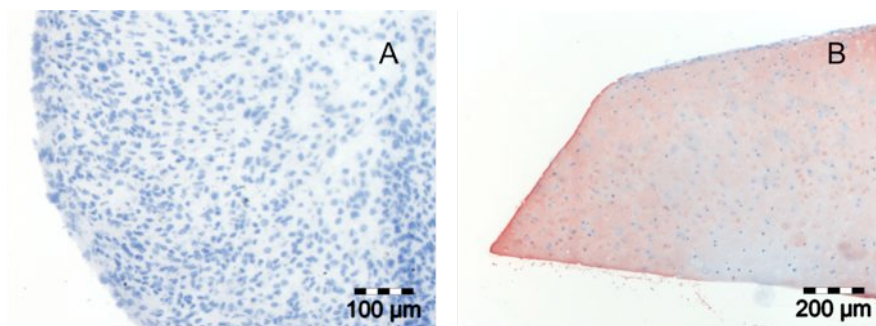


Abbildung 23: Immunhistochemischer Kollagen Typ II Nachweis technische Kontrolle (A) und Positivkontrolle (B)

Immunhistochemisch (Abbildung 24) ließen sich bei allen drei Spendern knorpelspezifisches Kollagen Typ II nachweisen.

Im Gegenzug dazu entwickelten die nicht mit TGF-β3 induzierten osteoarthrotischen MPC ein faseriges Gewebe, dessen extrazelluläre Matrix weder reich an Proteoglykanen noch an

Kollagen Typ II war. Zur Abbildung wurden die Schnitte von Spender 2 gewählt, da dieser im Durchschnitt aller drei Spender lag (Abbildung 25).

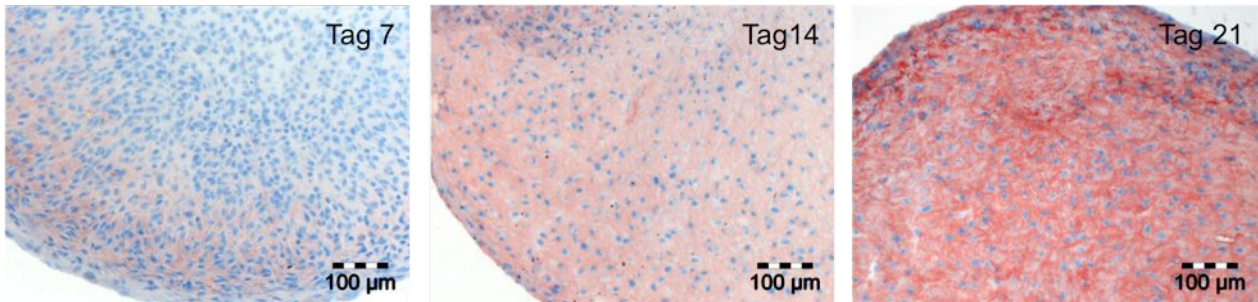


Abbildung 24: TGF- β 3 induzierte oaMPC zeigen immunhistochemisch einen deutlichen Anstieg der Färbung von Tag 7 bis Tag 21 und damit eine Zunahme an Kollagen Typ II

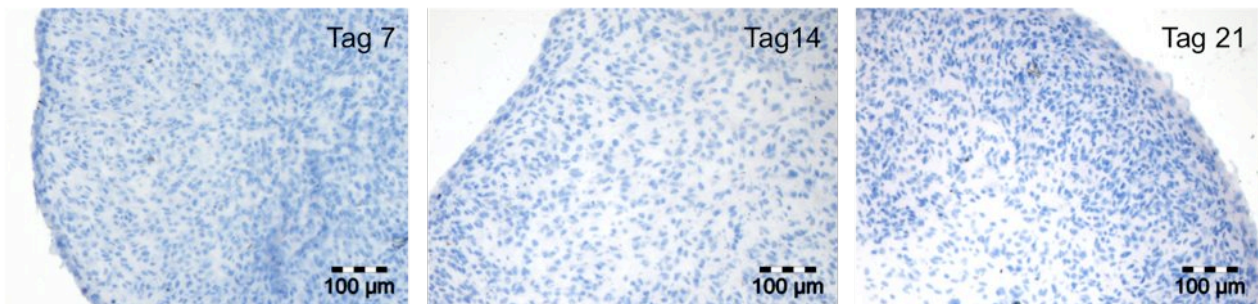


Abbildung 25: Nicht induzierte oaMPC zeigen immunhistochemisch keine Färbungszunahme als Mangel an Proteoglykanen und Kollagen Typ II

4.5 Adipogene Differenzierung

Nach Induktion und Wachstum der Zellen zeigten sich Lipidvakuolen (Abbildung 26 A-C). Nach 21 Tagen wurden die Lipidvakuolen mittels Oil Red O-Färbung angefärbt und dokumentiert. Es gelang, alle drei Spender hinsichtlich der adipogenen Zelllinie zu differenzieren, was durch die Anfärbbarkeit der Lipidvakuolen nachgewiesen wurde. Die Form und Größe der Vakuolen variierten von Spender zu Spender (Abbildung 26 D-F).

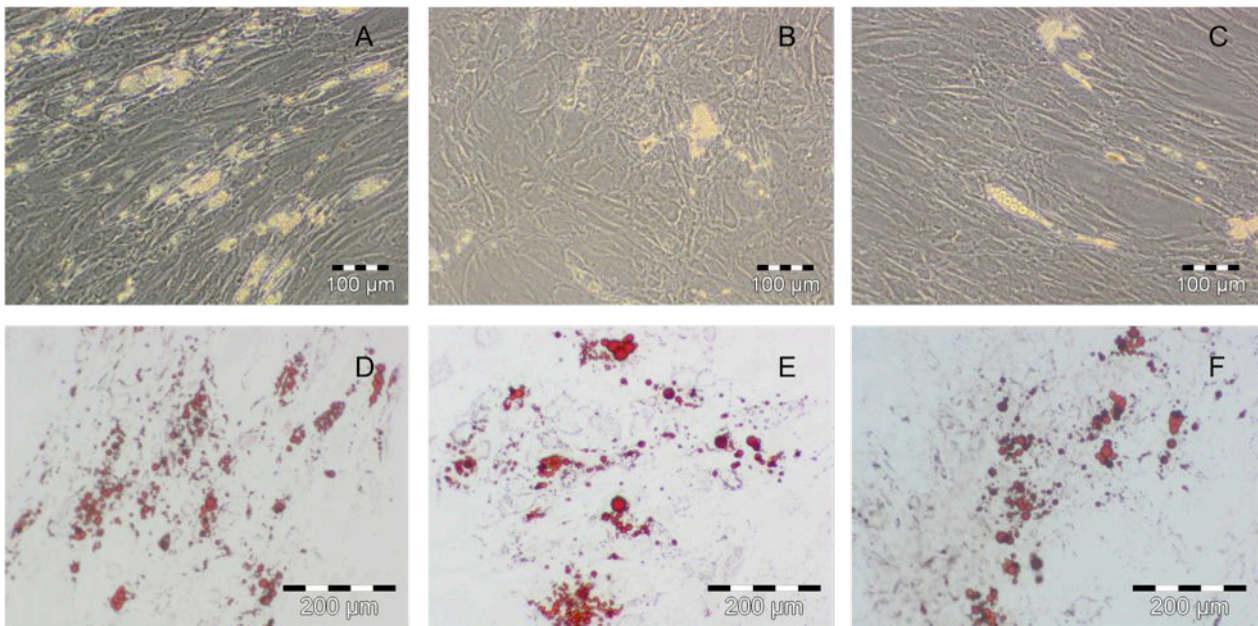


Abbildung 26: Bereits früh lassen sich Lipidvakuolen mit bloßem Auge erkennen; Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C). In der Oil Red O-Färbung zeigen sich die Lipidvakuolen nach 21 Tagen deutlich rot angefärbt. Spender 1(D), Spender 2 (E), Spender 3 (F)

Die Negativkontrollen zeigten keine gefärbten Lipidvakuolen (Abbildung 27).

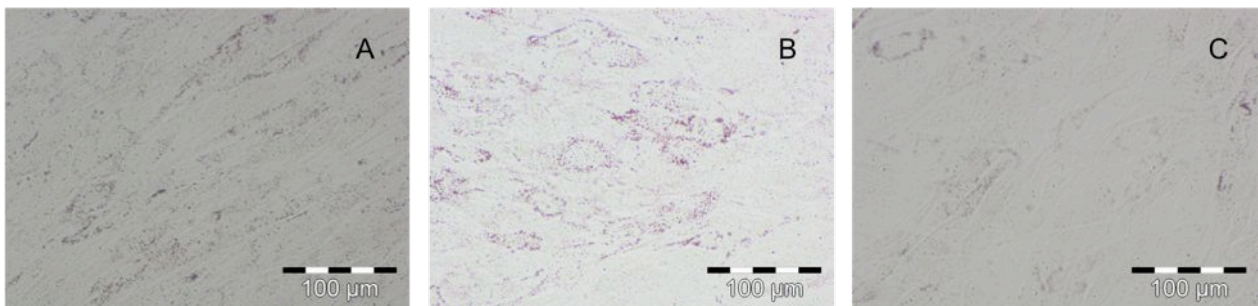


Abbildung 27: Oil Red O gefärbte Negativkontrollen der Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

4.6 Osteogene Differenzierung

Die von Kossa gefärbten osteogen induzierten oaMPC zeigten durch den Austausch von Kalzium mit Silberionen und die Reduktion zu Silber eine Färbung von braun bis hin zu schwarz entsprechend dem Grad der Kalzifizierung (Abbildung 29).

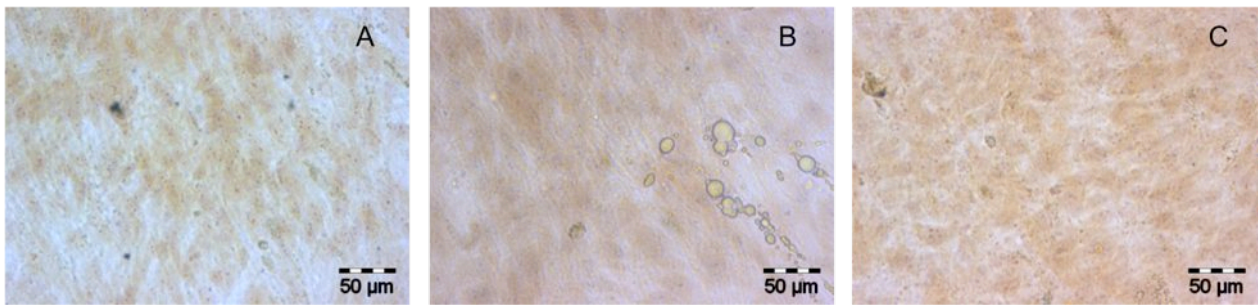


Abbildung 28: Die osteogen induzierten oaMPC zeigen eine Braunfärbung der Matrix nach von Kossa Färbung als beginnendes Zeichen der Kalzifizierung. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

Die nicht induzierten oaMPC (Abbildung 29) zeigten keine Anzeichen von Matrix-Kalzifizierung.

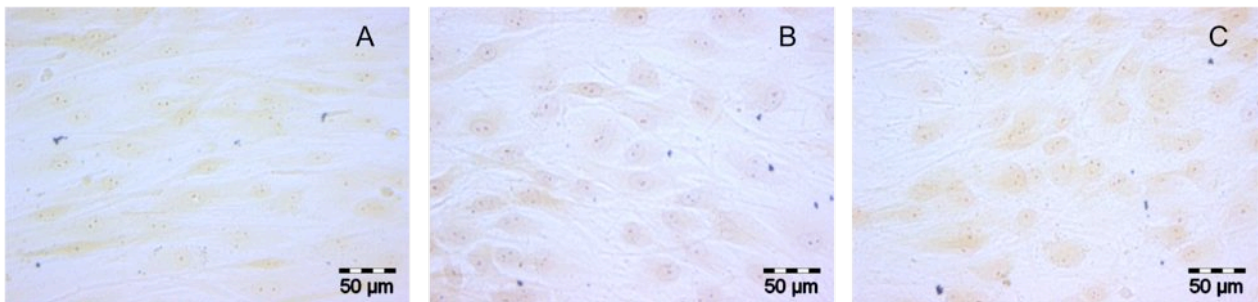


Abbildung 29: Nicht osteogen induzierte oaMPC ohne Kalzifizierungsnachweis. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)

4.7 Genexpressionsanalyse der oaMPC

Zum Nachweis der Chondrogenese wurden induzierte und nicht induzierte oaMPC (Tag 14) auf knorpelspezifische Gene hin untersucht. Kollagen Typ II, Aggrekan, Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), Linkprotein HAPLN1 und Kollagen Typ IX wurden mittels PCR nachgewiesen und deren Expressionsrate zum Haushaltsgen GAPDH in Relation gebracht. Des Weiteren wurde Kollagen Typ I als Bestandteil der Extrazellulären Matrix von Reparaturgewebe nachgewiesen. Dabei zeigten die Expressionslevel aller Knorpelzellmarker bei TGF- β 3 induzierten oaMPC einen signifikanten Anstieg ($\#p < 0,01$) gegenüber den nicht induzierten oaMPC.

Bei den TGF- β 3 induzierten oaMPC zeigte sich ein hoher Expressionsanstieg von Kollagen Typ II, der zwischen 130-397% relativ zur Expression von GAPDH lag (Spender 1 397%, Spender 2 171%, Spender 3 127%). Im Vergleich zeigten die nicht induzierten Zellen nur einen marginalen Anstieg des Expressionsniveaus von 0,07-1,78% relativ zur Expression von GAPDH. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der histologischen Kollagen Typ II Färbung.

Das chondrogene Markergen Aggrekan zeigte im Mittel immer noch einen Anstieg der Werte um das zehnfache und lag bei den nicht induzierten Zellen bei $1,8\% \pm 0,7\%$ zur relativen Expression

GAPDH und bei den induzierten oaMPC bei $23,5\% \pm 6,8\%$ zur relativen Expression GAPDH. Spender 1 und 2 zeigten mit 20% bzw 19,2% eine ähnliches Expressionsverhalten, während bei Spender 3 das Expressionslevel mit 31,4% deutlich höher lag (Abbildung 30).

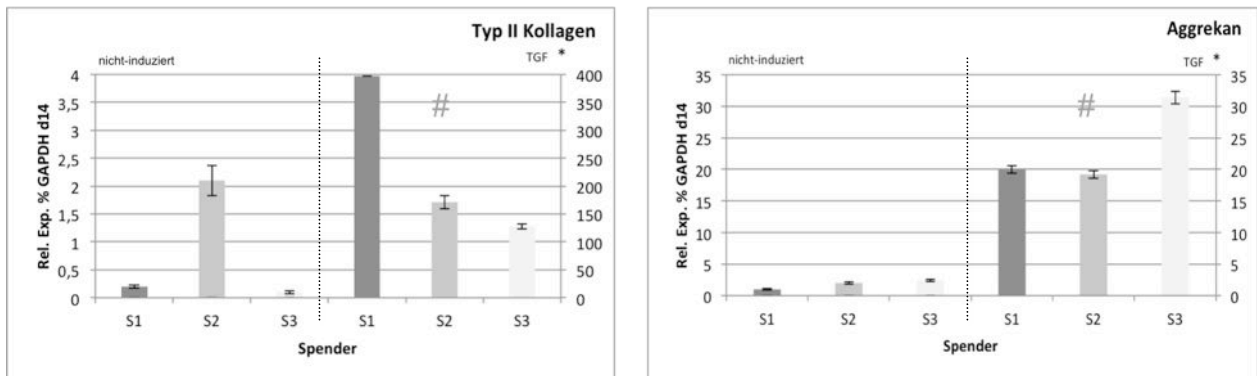


Abbildung 30: Genexpressionsanalyse aller Spender; Kollagen Typ II und Aggrekan mit signifikanter Erhöhung der relativen Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC ($\#p < 0,01$)

Die Expression von COMP lag zwischen 111%-181% zur relativen Expression GAPDH und damit auf einheitlich hohem Niveau. Bei den nicht induzierten Zellen hingegen zeigte Spender 2 eine Expression von 46% im Vergleich zur relativen Expression GAPDH. Spender 1 und 3 lagen mit 3,2% bzw. 3,4% zur relativen Expression GAPDH deutlich unter den induzierten oaMPC.

Bei den Proteinen HAPLN1 und Kollagen Typ IX zeigte sich ein einheitliches Bild aller drei Spender. Im Schnitt lag HAPLN1 bei $108\% \pm 27\%$ zur relativen Expression GAPDH und Typ IX Kollagen bei $102\% \pm 29\%$ zur relativen Expression GAPDH bei den induzierten oaMPC (Abbildung 31, Abbildung 32). Die Genexpression aller Knorpelmarker zeigte somit einen signifikanten Anstieg der Expressionsrate in Bezug zur relativen Expression von GAPDH ($\#p < 0,01$).

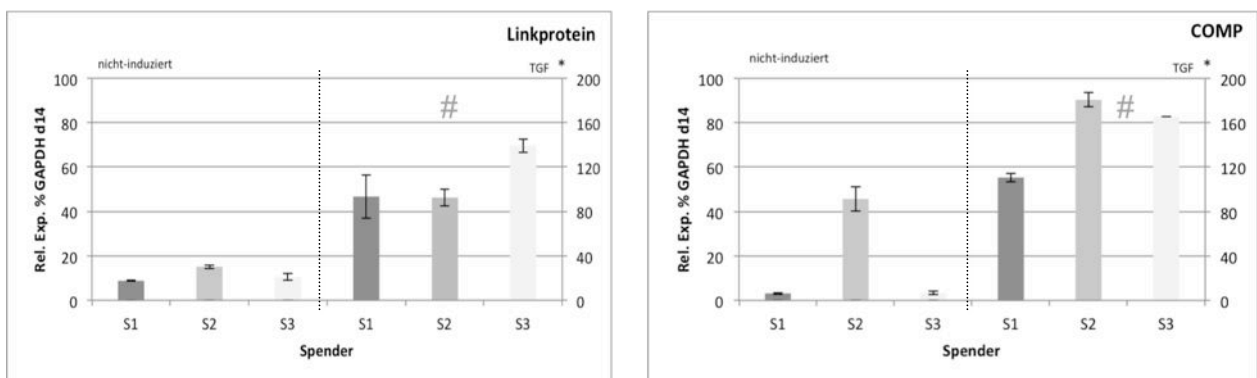


Abbildung 31: Genexpressionsanalyse aller Spender; Linkprotein und COMP mit signifikanter Erhöhung der Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC ($\#p < 0,01$)

Die Expression von Kollagen Typ I lag bei den nicht induzierten oaMPC zwischen 398-810% zur relativen Expression GAPDH und bei den TGF- β 3 induzierten Zellen im Bereich von 692-1855% zur relativen Expression GAPDH. Hierbei zeigten sich von Spender zu Spender deutliche Unterschiede. So stieg die Expressionsrate von Spender 1 von 810% auf 1850%, die von Spender 3 stieg von 524% auf 1655% und bei Spender 2 zeigte sich jedoch ein eindeutig geringerer Anstieg bei bereits deutlich niedrigeren Ausgangslevel von 398% auf 692% (Abbildung 32).

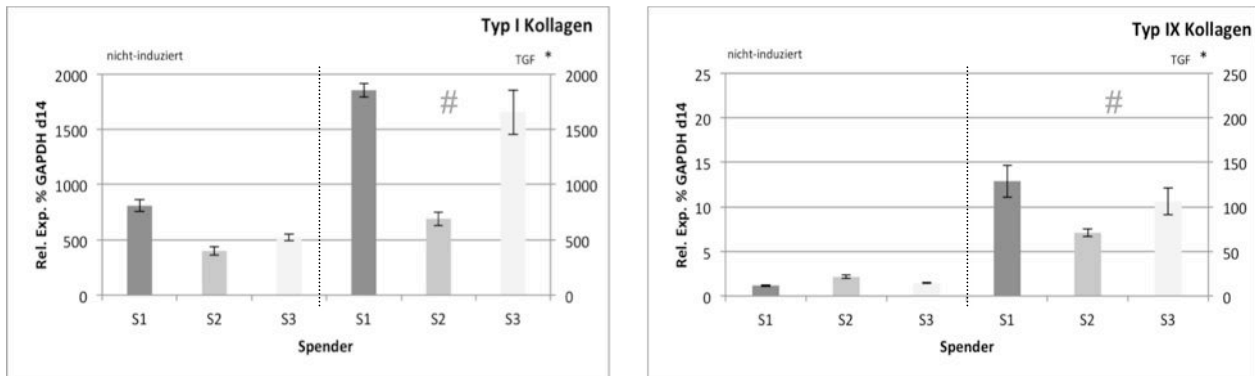


Abbildung 32: Genexpressionsanalyse aller Spender; Kollagen Typ I und Kollagen Typ IX mit signifikanter Erhöhung der Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC (# $p < 0,01$)

Zum Ausschluss von hypertrophen Wandlungen oder einer osteogenen Induktion der oaMPC-Zellpelletkulturen wurden zusätzlich die Genmarker Osteocalcin und der Kollagen Typ X bestimmt. Zusätzlich wurde die Genexpression des Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP-4) nachgewiesen. In der PCR Analyse zeigte sich eine signifikante Erhöhung (# $p < 0,01$) in der relativen Expression zu GAPDH von Kollagen-Typ X in induzierten oaMPC gegenüber nicht induzierten Zellen. Das Expressionsniveau für das osteogenen Markergen Osteocalcin sowie für die Expression von FABP-4 zeigte sich im Vergleich zwischen nicht induzierten und induzierten oaMPCs jedoch eine signifikante Erniedrigung (* $p < 0,01$) der Expressionsrate (Abbildung 33).

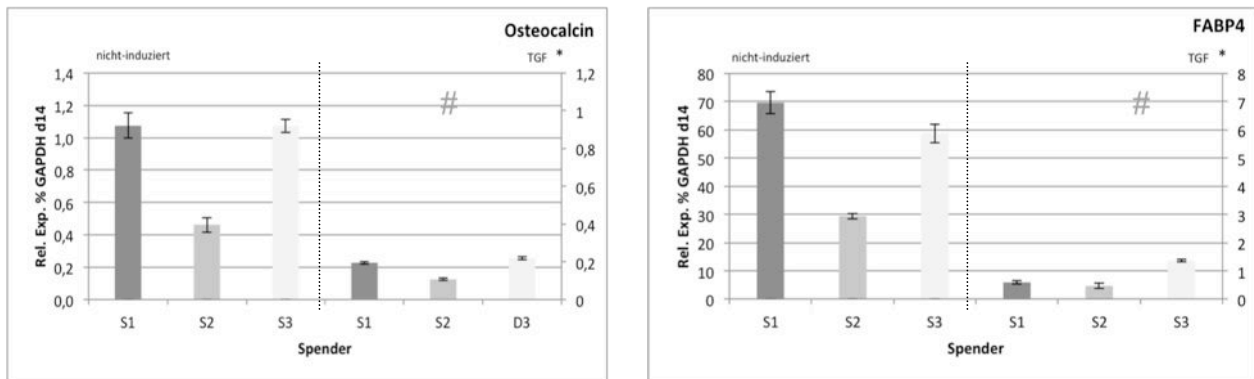


Abbildung 33: Genexpressionsanalyse aller Spender; Osteocalcin und FABP-4 mit signifikanter Erhöhung der Expression in nicht-induzierten oaMPC im Vergleich zu induzierten oaMPC (# $p < 0,01$)

Aufgrund der signifikanten Erhöhung der Kollagen-Typ X-Genexpression (Abbildung 34) kann dies als beginnendes Zeichen einer Hypertrophie der oaMPC gewertet werden.

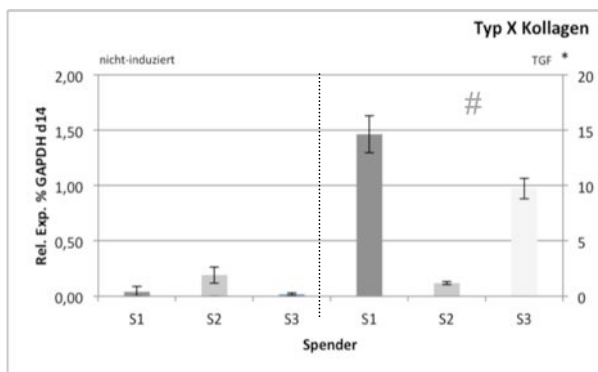


Abbildung 34: Genexpressionsanalyse aller Spender; Kollagen Typ X mit signifikanter Erhöhung der Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC (# $p < 0,01$)

Zur Differenzierung zwischen einer Hypertrophie auf Gen- oder Proteinebene wurden die Zellpellets zusätzlich am Tag 21 sowohl mit der Oil Red O-Färbung als auch mit der von Kossa-Färbung gefärbt. Dabei zeigte sich eine durchgängig negativ Färbung (Abbildung 35). Anscheinend hat hier eine mögliche Hypertrophie der Zellen auf Gen-Ebene stattgefunden, welche jedoch nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte.

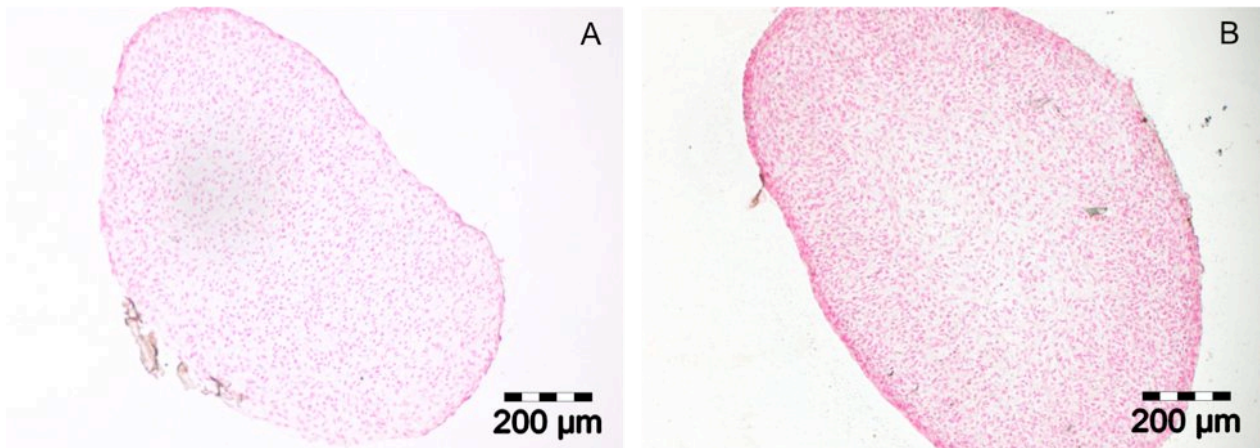


Abbildung 35: Zum Ausschluss der Hypertrophie durchgeführte Oil Red O- und von Kossa-Färbung bei chondrogen induzierten oaMPC Zellpelletkulturen

4.8 Vergleich der Zellen

Zum Vergleich zwischen mesenchymalen Vorläuferzellen aus gesunden Spendern und Zellen aus Spendern mit Osteoarthrose wurde auf Daten aus der eigenen Forschungsgruppe zurückgegriffen. Dabei wurden mesenchymale Vorläuferzellen von sechs gesunden Spender (31) und drei weitere Spender mit Arthrose (33) untersucht. Die Ergebnisse wurden aus Umfangsgründen nicht dargestellt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass subchondral gelegene Zellen aus osteoarthrotisch veränderten Gelenken mesenchymalen Vorläufercharakter besitzen, sich in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung differenzieren lassen sowie chemotaktisch rekrutiert, und *in vitro* kultiviert und expandiert werden können. Ferner wurde diese Charakterisierung mit Zellen gesunder Spender aus vorangegangenen Versuchen derselben Arbeitsgruppe verglichen, um das reelle Potential der oaMPC zu analysieren. Dazu wurden Zellen von drei Spendern eingehend auf Wachstumskinetik, Migrationsverhalten, Oberflächenantigene, spezifische Genexpression, und Zelldifferenzierung untersucht. Diese Erkenntnisse können als Basis für weitere gelenkerhaltende Therapieansätze bei Arthrose dienen.

Die isolierten oaMPC zeigten *in vitro* eine fibroblastenartige Morphologie und bei Erreichen einer Konfluenz von 90% ein wirbelartiges Muster und unterschieden sich somit nicht von MPC der gesunden Spender (31). In den Untersuchungen zur Wachstumskinetik wurden die oaMPC bis zur Passage 8 kultiviert und analysiert. Dabei zeigten sie bis zur 7. Passage ein stabiles Wachstumsverhalten, in Passage 8 zeigten sich zunehmende Veränderungen hinsichtlich des Kultivierungsverhaltens. So siedelten sich weniger Zellen am Flaschenboden an bzw. kam es zu einer Stagnation der Wachstumsrate. Daher wurden für Berechnungen der Wachstumskinetik Zellen bis zur Passage 7 eingeschlossen. Die durchschnittliche Wachstumsrate μ , die Populationsverdoppelungszeit und die Populationsverdoppelungsrate zeigten bei allen drei Spender keine größeren Unterschiede. Unterschiede in der Zellzahl von gesunden Spendern und Osteoarthrose-Spendern wurden anhand der Populationsverdoppelung pro Passage geführt. Diese lag bei oaMPC bei $1,16 \pm 0,08$ Verdoppelungen pro Passage, bei MPCs zwischen 1,8 - 2,4 Verdoppelungen. Dies entspricht dem Ergebnis von anderen Untersuchungen zu osteoarthrotisch veränderten Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen (57, 58, 59, 60). Untersuchungen von Dudics et al. zeigten, dass bei den Krankheitsbildern von Osteoarthrose und rheumatoider Arthritis, die in demselben klinischen Befund der Knorpeldestruktion enden, kein Unterschied hinsichtlich der Wachstumskinetik von mesenchymalen Stammzellen besteht (61). Somit lässt sich die reduzierte Wachstumsrate durch die vorbestehende Grunderkrankung des Spenders sehr wahrscheinlich erklären.

Zur weiteren Überprüfung von Charakteristik und Potential der oaMPC wurden weiterführende Untersuchungen unternommen. Das Migrationsverhalten von oaMPC wurde anhand von chemotaktischen Versuchen mit fünf Prozent und zehn Prozent Humanserum experimentell

untersucht. Hier zeigte sich, dass fünf Prozent Humanserum 36-48% der Zellen zur Chemotaxis anregte, während bei zehn Prozent Humanserum nur 21-34% der Zellen chemotaktisch migrierten. Ruster et al. zeigten bereits, dass mesenchymale Stammzellen durch Humanserum rekrutiert werden können (62). Die abfallende Migrationskurve ist als Plateauwert bei konstanter Induktion zu interpretieren (63). Die spontane Migration wurde bisher vernachlässigt. In der Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass mit steigender Serumkonzentration auch die Rate der Chemokinese signifikant anstieg. Bisherige Untersuchungen zur Chemotaxis beschränkten sich meist auf ein einzelnes Chemokin (64). Daher wurden bei der Untersuchung der Spontanmigration zur Ausschaltung des Gradienten in der oberen und unteren Ansatzreihe Chemokine hinzugegeben. Die Untersuchungen erbrachten eine vernachlässigbar kleine Anzahl an Chemokinese (65). Um mit Humanserum chemotaktische Untersuchungen bei oaMPC sicher analysieren zu können, wurden Chemotaxis und Chemokinese für unterschiedliche Serumkonzentrationen untersucht. Auffällig war die hohe Zahl an spontan migrierenden Zellen, die wahrscheinlich aus der großen Anzahl an verschiedenen Chemokinen im Humanserum resultiert (66). Analysen zur gerichteten Chemotaxis zeigten, dass Humanserum im Vergleich nur über eine niedrige chemotaktische Wirkung verfügt und deutlich wirkungsvollere Chemokine existieren (67).

Die isolierten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Oberflächenantigene hin untersucht. Dabei zeigten sich die Zellen für die Antigene CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166 (>90%) durchgängig positiv. Der Nachweis von CD14, CD34 und CD45 lag dabei unter 1% und zeigte im Vergleich zu den vorangegangenen Studien zu MPC von gesunden Spendern keinen Unterschied. Das Oberflächenantigen STRO-1 wurde bei der Analyse der oaMPC nicht mehr als relevantes Oberflächenantigen angesehen, da in Untersuchungen von schnell regenerierende Zellen kein Nachweis von STRO-1 erbracht werden konnte und STRO-1 nur vereinzelt für MPC nachgewiesen werden konnte und somit nicht mehr erfasst wurde (68).

Zur Bestimmung des Differenzierungspotentials wurden die Zellen mit verschiedenen Induktionsmedien versetzt und die Ergebnisse histologisch, immunhistochemisch und mittels Genexpressionsanalyse verifiziert. Die adipogen induzierten Zellen zeigten dabei die Entwicklung von Lipidvakuolen, die mit Dauer der Kultivierung stetig zunahm. Der Nachweis der Vakuolen wurde durch eine Oil Red O-Färbung geführt und zeigte den Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen auf. Im Vergleich zu den Untersuchungen von MPC zeigte sich ein erhöhtes adipogenes Differenzierungspotential. Ein vermindertes Potential im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen konnte somit nicht bestätigt werden (69,70).

Der Kalzifizierungsnachweis wurde mit der von Kossa Färbung geführt. Hier zeigte sich eine Braunfärbung der Matrix, das osteogene Potential schien jedoch nicht stark genug, um eine

Schwarzfärbung zu erreichen. Dieses Ergebnis ließ sich für MPC und oaMPC nachweisen. Die Literaturlage ist hier kontrovers. In anderen Untersuchungen zeigte sich, dass osteogen induzierte Vorläuferzellen auch bei Vorerkrankungen durchaus die Fähigkeit zu einer hohen Kalzifizierung besitzen (71). Chua et al. zeigten, dass Zellen gesunder Spender ein höheres osteogenes Differenzierungspotential als Zellen von osteoarthrose Spendern besitzen (72). Daher lässt sich nicht abschließend klären, ob die geringere Kalzifizierung auf die osteoarthrotische Veränderung des Gelenkes zurückzuführen ist, oder ob es sich um eine Normalvariante der mesenchymalen Vorläuferzellen handelt.

Zur Untersuchung des chondrogenen Differenzierungspotentials wurden aus den oaMPC-Hochdichtepelletkulturen angelegt und mit chondrogenem Nährmedium (TGF- β 3) für 21 Tage kultiviert. Die aus Zellpellets erhaltenen histologischen Schnitte wurden zum Proteoglykannachweis mit Safranin O und Alcianblau gefärbt. Hier zeigte sich ab Tag 7 bis Tag 14 eine Zunahme an Proteoglykanen. Von Tag 14 bis Tag 21 konnte kein weiterer Anstieg an Proteoglykanen nachgewiesen werden. Die nicht induzierten Zellen zeigten eine grün-violett Färbung. In einigen Teilbereichen der nicht induzierten Zellpellets zeigten sich vereinzelt leichte Blaufärbungen. Hier ist von einem bekannten 3D-Effekt auszugehen. Verlassen die Zellen ihre Ein-Zell-Schichtigkeit, kann dies zur Induktion der Chondrogenese führen. Dieser Induktor ist deutlich weniger Potent als TGF- β 3 (73). Ein Unterschied zwischen MPC und oaMPC konnte nicht festgestellt werden.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zielten in erster Linie auf den Nachweis von Kollagen Typ II ab, dem Hauptbestandteil von hyaliner Knorpelmatrix. In den angefertigten Schnitten zeigte sich eine deutliche Zunahme der positiven Rotfärbung und somit der Kollagen Typ II-Synthese von Tag 7 bis Tag 21 bei der induzierten Untersuchungsreihe. Die Kontrollgruppe erbrachte keinen Nachweis des Kollagen Typs II. MPC und oaMPC zeigten vergleichend einheitliche Färbungszunahmen (31). Zur Verifizierung des histologischen / immunhistochemischen Färbungsergebnisses wurden parallel wichtige Gene der Chondrogenese nachgewiesen (Kollagen Typ II, Kollagen Typ IX, Aggrekan, HAPLN1, COMP). Es zeigte sich in der Genexpressionsanalyse ein signifikanter Anstieg der Markergene sowohl bei MPC als auch bei oaMPC am 14. Tag nach Induktion mit TGF- β 3. Die Genexpressionsanalyse bezüglich Kollagen Typ I zeigte als Zeichen der Arthrose einen alleinigen Anstieg bei den oaMPC und könnte so mit der Entstehung eines faserknorpeligen Reparaturgewebes oder eines hyalin-faserigen Hybridgewebes in Verbindung stehen (34).

Die Gene Osteocalcin und Kollagen Typ X wurden zum Ausschluss einer Hypertrophie der Zellen quantifiziert. Da sich bei der osteogenen Differenzierung bei zwei Spendern die Ausbildung von Lipidvakuolen zeigte, wurde FABP4 ebenfalls bestimmt. Bei der Untersuchung

von induzierten und nicht induzierten Zellen zeigte sich ein signifikanter Rückgang von Osteocalcin und FABP4, Kollagen Typ X stieg dagegen an. Der Kollagen Typ X-Anstieg ist aus anderen Untersuchungen mit TGF- β 3 induzierten Zellen bekannt (74). Bereits im Jahr 1992 konnten von der Mark et al. einen signifikanten Kollagen Typ X-Anstieg bei Knorpelzellen aus osteoarthrotisch veränderten Gelenken nachweisen und zeigten so eine Neigung zur Hypertrophie der Knorpelzellen in Arthrosegelenken (75). Eine zusammenfassende Untersuchung von *in vitro*- und *in vivo*- Analysen der Knorpelzellhypertrophie belegte, dass Kollagen Typ X zu den Markern der Hypertrophie zählt und nicht nur unter Versuchsbedingungen, sondern auch bei der Genese der Osteoarthrose natürlicherweise vorkommt (76). Hypertrophierte Knorpelzellen werden unter dem Einfluss von Mediatoren der TGF-Superfamilie schlussendlich apoptotisch und führen zur subchondralen Sklerose, eine der typischen arthrotischen Veränderungen (77). In den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich eine Hypertrophie der Zellen auf Genebene. Ein Anhaltspunkt für eine Hypertrophie der Zellen auf Proteinebene konnte durch von Kossa- und Oil Red O-Färbung für oaMPC nicht erbracht werden. Hier zeigte sich ein vergleichbares Potential zur Differenzierung wie sie bei gesunden MPC-Spendern gefunden wird (31). Dies ist eine essentiellen Erkenntnis dieser Arbeit und kann als Grundlage für gelenkerhaltende Therapieoptionen angesehen werden. Eigentlich ist die Arthrose als ein entzündungsfreies Krankheitsbild definiert. Jedoch zeigt sich im Akutzustand der aktivierten Arthrose sehr wohl der Anstieg des Entzündungsmarkers C-reaktiven Protein (CRP) im Serum der Patienten und gleicht hier der rheumatoiden Arthritis. Cecil et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass durchaus eine Korrelation zwischen den erhöhten Entzündungsparametern bei Arthrose und der Hypertrophie von Chondrozyten im arthrotisch veränderten Gelenk besteht (78). Weiterführend wurde der Anstieg von Kollagen Typ X im Serum von 271 Arthrose-Patienten untersucht. Kollagen Typ X sowie weitere Knorpelmarker gelangen über Gefäße, die bei der Arthrose induzierte Angiogenese gebildet wurden, in die Blutbahn des Patienten und können so im Serum nachgewiesen werden. Hier zeigten sich korrelierende, signifikant erhöhte Werte von Kollagen Typ X, CRP und C2M (matrix metalloproteinase-derived fragments of type II collagen), einem Knorpeldestruktionsmarker im Serum, und bestätigten einen Zusammenhang zwischen der Entzündungsreaktion und der Zellhypertrophie (79). Dies ist ein Zusammenhang, der auf zellulärer Ebene in dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Hieraus lässt sich eine Korrelation zwischen Narbenbildung und Entwicklung eines minderwertigen Reparaturgewebes bei durchgeführter Pridie-Bohrung nachweisen (34,80).

In vitro-Analysen von Knorpelzellzüchtungen erbrachten beim Tissue Engineering von Knorpel bereits erste Ansätze, um einer Hypertrophie entgegenzuwirken. Hier zeigte sich, dass die

benutzten Substrate wie eine zellfreie extrazelluläre Matrix und die Verwendung von mesenchymalen Vorläuferzellen ein hohes Potential besitzen, der Hypertrophie entgegenzuwirken (81).

Bei der Mikrofrakturierung werden durch den Blutstrom mesenchymale Stammu zur Differenzierung in den Defekt eingeschwemmt. Auch andere subchondral gelegene Zellen wie die oaMPC werden durch die Fakturierung in den Defekt gebracht und zur Differenzierung angeregt (82). Weitere Untersuchungen ergaben, dass durch den Knorpeldefekt aus umliegenden, noch gesunden Knorpelanteilen chondrogene Vorläuferzellen rekrutiert werden und diese ebenfalls in das Defektareal einwandern (83;84). Dehne et al. zeigten in ihren Analysen, dass das chondrogene Differenzierungspotential von humanen Chondrozyten, die aus arthrotischen Gelenken gewonnen wurden, keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Differenzierungspotentials, wie sie von gesunden Chondrozyten bekannt sind, aufweisen (85). Anzumerken ist, dass bei Untersuchungen von mesenchymalen Stamm-, Vorläufer- und Chondrozyten-Zellkulturen gezeigt werden konnte, dass für die Differenzierung von mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen zu Chondrozyten in fokalen Defekten eine gewisse Anzahl von bereits invaginierten Chondrozyten mit direktem Zell-Zell-Kontakt über GAP-Verbindungen essentiell für eine qualitativ höherwertige Ausbildung von knorpelartigen Gewebe vorhanden sind (86). Die Einwanderung von verschiedenen Zellarten scheint ein Garant für ein gutes klinisches Ergebnis zu sein.

Weiter konnte nachgewiesen werden, dass Synovialflüssigkeit aus arthrotischen Gelenken keinen negativen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von subchondralen Vorläuferzellen besitzt. Allenfalls zeigten Zellen aus einem arthrotischen Milieu eine etwas verzögerte Bildung der Knorpelmatrix (87). In Zusammenschau sollte somit eine chondrogene *in vivo* Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen aus osteoarthrotisch veränderten Gelenken in einer 3D-Trägerstruktur möglich sein.

Untersuchungen mit zellfreien und plättchenreichem Plasma behandelten Matrixen, die nach Anbohren der subchondralen Sklerose in den Knorpeldefekt implantiert wurden, zeigten viel versprechende Ansätze, die Differenzierung von einströmenden MPC und oaMPC zu unterstützen und höherwertiges, hyalin-ähnliches Knorpelgewebe auszubilden. Diese Kombination von knochenstimulierender Operation mit dem Einsatz von zellfreien 3D-PGA-Matrixen zeigten in einer Fünf-Jahres-Follow-Up-Studie von Patienten mit fortgeschrittener Gelenkdegeneration und fokalen Vollschichtdefekten eine signifikant höhere Zufriedenheit. Die histologischen Nachuntersuchungen zeigten ein homogenes hyalin-artiges Knorpelreparaturgewebe mit runden Chondrozyten und eine gute Integration des Reparaturgewebes in den Knochendefekt. Die Autoren empfehlen hier eine gute anti-

inflammatorische Therapie vor und nach der Operation und begründen damit zum Teil den Erfolg dieser Behandlung (88, 89). Anzumerken ist, dass hier nur fünf der behandelten Patienten histologisch nachuntersucht wurden. Alle Patienten im Follow-Up wurden mittels Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue Score (MOCART) nachuntersucht.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Bark et al., die eine deutliche Überlegenheit der Matrix gestützten Mikrofrakturierung im Vergleich zur reinen Mikrofrakturierung hinsichtlich des klinischen Ergebnisses nachweisen konnten (90).

Entscheidend für den Heilungsverlauf scheint auch die Technik der Mikrofrakturierung zu sein. Die benutzten Bohrdrähte oder Ahlen sollten einen maximalen Durchmesser von 1mm besitzen, um beste Resultate zu erzielen (91). Ein weiterer Schritt ist die Nanofrakturierung, neben dem Durchmesser (1mm) wird auch die Eindringtiefe (9mm) des Instrumentes definiert und ermöglicht so das bestmögliche Einschwemmverhalten der mesenchymalen Vorläuferzellen in den Defekt, woraus ein besseres klinisches Ergebnis resultiert (92). Pascarella et al. zeigten in ihrer Untersuchung, dass eine hohe Anzahl von eingeschwemmten mesenchymalen Stammzellen auch ein besseres klinisches Ergebnis erzielten. Sie postulieren hierfür eine Eröffnung des Markraumes als Quelle für zahlreiche Stammzellen (93).

Zellfreie Matrixen werden entweder mittels Arthrotomie oder durch einen arthroskopischen Zugang implantiert. Am häufigsten wird ein minimalinvasiver offener Zugang gewählt. Eine Überlegenheit eines Zuganges konnte bisher nicht herausgestellt werden (94). Chen et al. untersuchten in ihrer Arbeit ob ein Unterschied zwischen Mikrofrakturierung und Pridie-Bohrung besteht. Es zeigte sich, dass die Komorbidität mit postoperativer Osteonekrose und subchondralen Veränderungen bei der Pridie Bohrung vermutlich durch die entstehende Hitze einwirkung deutlich erhöht war (95). Ein Unterschied bezüglich des klinischen Ergebnisses von unterschiedlichen Befestigungsmethoden der Matrix im Knorpeldefekt konnte in Nachuntersuchungen nicht ausgemacht werden (96).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit das Differenzierungspotential und somit der Vorläuferstatus von osteoarthrotischen mesenchymalen Vorläuferzellen bestimmt bzw. bestätigt werden. Vergleichend mit MPC von gesunden Spendern konnte kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden und Arthrose-Spendern herausgestellt werden. Lediglich bei der Neigung zur arthrosetypischen Zellhypertrophie zeigten sich auf Genexpressionsebene Unterschiede, die für das Potential an sich jedoch nicht als signifikant einzustufen sind. Techniken zur gelenkerhaltenden Therapie, die sich diese Eigenschaften bereits zunutze machen, etablieren sich zunehmend und bieten in Kombination mit konservativen Ansätzen eine gute Alternative, zur Therapie der Arthrose. Die untersuchten oaMPC zeigten ein hohes Potential für zellfreie

Oberflächenresitutionsansätze. Somit scheint der Schlüssel zur erfolgreichen Therapie die Kontrolle der inflammatorischen Reaktion im osteoarthrotisch veränderten Gelenk.

6 Thesen

- I. Die Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung des Menschen und zählt zu den Volkskrankheiten. Am meisten betroffen sind Knie- und Hüftgelenke.
- II. Die Behandlung der Arthrose gliedert sich in ein konservatives (Medikamentengabe) und operatives Vorgehen. Dabei sollten vor der Operation konservative Maßnahmen ausgeschöpft sein. Eine stadiengerechte Therapie existiert nicht.
- III. Operativ unterscheidet man gelenkerhaltende (Pridie-Bohrung, Mosaik-Plastik, ACT, Umstellungsosteotomie) und gelenkersetzende Therapien (Oberflächenersatz).
- IV. Zur Einteilung von Knorpelschäden hat sich das ICRS Hyalin Cartilage Lesion Classification System, zur Klassifizierung des Arthrose-Stadiums die Einteilung nach Kellgren und Lawrence etabliert.
- V. Auf Zellenebene werden stetig exprimierte Haushalts-Gene von spezifischen Zellgenen unterschieden. Zellen werden anhand von spezifischen Zellgenen, von Proteinbildung und von spezifischen Oberflächenantigenen identifiziert und eingeteilt.
- VI. Sowohl auf MPC als auch auf oaMPC werden entsprechend den Vorgaben der International Society of Cellular Therapy die Oberflächenantigene CD15, CD44, CD73, CD90, CD 105, CD116 für mesenchymale Vorläuferzellen präsentiert. Hämatopoetische Oberflächenantigene (CD14, CD45) konnten nicht nachgewiesen werden.
- VII. Zellen von gesunden und Arthrosespendern zeigen eine vergleichbare, durch Humanserum chemotaktisch induzierte Migration. Die Bereitschaft zur spontanen Chemokinese steigt mit zunehmender Humanserumkonzentration signifikant an.
- VIII. Mit TGF- β 3 induzierte MPC und oaMPC zeigen gleiches chondrogenes Differenzierungspotential auf Gen- und Proteinebene. Die Expression von Kollagen Typ X ist bei oaMPC als Zeichen der Hypertrophie signifikant erhöht.
- IX. Adipogen induzierte Zellen, MPC und oaMPCs zeigen gleichermaßen, die Ausbildung von Fettvakuolen und die Expression von spezifischen Genen (PPAR γ , FABP4).
- X. Bei osteogen induzierten Zellen zeigte sich eine zunehmende Kalzifizierung der Matrix.
- XI. Zellen von Arthrosespendern zeigen eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu Zellen von gesunden Spendern.
- XII. MPC und oaMPC besitzen eine verminderte Fähigkeit zur Kalzifizierung von extrazellulärer Matrix.

- XIII. TGF- β 3 ist sowohl für MPC als auch oaMPC ein starker Induktor der Chondrogenese. Die oaMPC zeigen im Vergleich eine signifikant höhere Expression von Kollagen Typ I und Typ X.
- XIV. Die Hypertrophie mit erhöhter Kollagen Typ I- und Typ X-Expression scheint verantwortlich für die Ausbildung von minderwertigen Knorpelreparaturgewebe bei osteochondralen Defekten. Diese zeigt sich jedoch nur auf Gen- und nicht auf Proteinebene.
- XV. Entzündungsreaktionen zeigten sich verantwortlich für die Hypertrophie der oaMPC.
- XVI. Die Arthrose sollte nicht mehr als entzündungsfreies Krankheitsbild definiert werden.
- XVII. Das nachgewiesene gleiche Differenzierungspotential von MPC und oaMPC ist wegweisend für die gelenkerhaltende Therapie von Arthrose.
- XVIII. Nach Pridie-Bohrung ausströmende oaMPC differenzieren sich in 3D-Matrixstrukturen zu hyalin-artigen Reparaturknorpeln.
- XIX. Die Kombination von konservativen, antiphlogistischen Behandlungskonzepten in Verbindung mit gelenkerhaltenden Operationen sind ein zukunftsweisender Therapieansatz.

7 Zusammenfassung

Die Arthrose zählt mittlerweile zu den Volkskrankheiten und ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit (1). Unterschiedliche Ätiologien enden in demselben klinischen Bild und bedürfen nach einer konservativen Therapie im Verlauf meist einer operativen Versorgung. Neben dem Ersatz des Gelenkes durch eine Prothese haben unterschiedliche gelenkerhaltende Operationen ihren Stellenwert in der Versorgung (5). Zunehmend etabliert sich die Versorgung durch regenerative Behandlungsoptionen wie der Mikrofrakturierung und dem Tissue Engineering. Diese Ansätze nutzen die Fähigkeit des menschlichen Körpers zur Selbstregenerierung (6,24). Jedoch bildet sich nach Mikrofrakturierung und dem dadurch verursachten Einschwemmen von Stamm- und Vorläuferzellen meist nur minderwertiges Reparaturgewebe (34). Untersuchungen zeigten, dass Defekte mit Mikrofrakturierung und anschließender Aufbringung einer zellfreien 3D-Trägermatrix deutlich besserer Ergebnisse erzielen (7). Bislang ist jedoch unklar, ob Vorläuferzellen von Patienten mit fortgeschrittener Osteoarthrose das Potential zur chondrogenen Differenzierung und damit zum Aufbau von Knorpelmatrix bzw. Reparaturgewebe in diesem Trägermaterial besitzen.

Um dies zu überprüfen, wurden isolierte mesenchymale Vorläuferzellen (MPC) aus drei Patienten mit fortgeschrittener Gonarthrose (oa) mittels *ex vivo*- und *in vitro*- Methodik durch den Einsatz von Induktoren auf ihr adipogenes, osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential untersucht.

Die MPC zeigten eine stabile Wachstumskinetik und bei Erreichen der Konfluenz eine spindelförmige, fibroblastenartige Morphologie. Die Migrationsfähigkeit der Zellen wurde durch Chemotaxisversuche untersucht und erbrachten eine Migration von 36-48% bei 5% Humanserum und 21-34% bei 10% Humanserum. Der Vorläuferstatus wurde mittels Positivnachweis durch FACS für die Antigene CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166 (>90%) bestätigt. Negativ zeigten sich die Zellen für die Antigene CD14, CD34 und CD 45 (<1%). Die oaMPC wurden durch verschiedene Induktoren zur Differenzierung in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung angeregt.

Entgegen anderen Untersuchungen zeigten die Zellen mit der Ausprägung von reichlichen Fettvakuolen eine deutliche adipogene Kapazität.

Osteogen induziert zeigte sich bei reduzierter Kalzifizierung der extrazellulären Matrix ein vermindertes Potential zur osteogenen Differenzierung. Zur chondrogenen Induktion wurden die Hochdichtezellpellets mit TGF- β 3 kultiviert. Zum Beweis der Knorpelregeneration wurden histologisch und immunhistochemisch Proteoglykane und Typ II Kollagen in der Matrix positiv nachgewiesen.

Auf zellulärer Gen-Ebene konnten Kollagen Typ II, Aggrekan, Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), Linkprotein HAPLN1 und Kollagen Typ IX als Chondrogenese typische Markergene mittels PCR nachgewiesen werden. Das multipotente Differenzierungspotential der osteoarthrotischen mesenchymalen Vorläuferzellen konnte somit bestätigt werden. Zusammenfassend besitzen mesenchymale Vorläuferzellen aus arthrotisch veränderten Gelenken die Potenz für den Einsatz bei gelenkerhaltenden Therapieoptionen zur Versorgung der Arthrose.

8 Anhang

Literaturverzeichnis

Zitate:

1. Felson DT. Epidemiology of knee and hip osteoarthritis. *Epidemiol Rev* 1988; 10: 1–28.
2. Rabenberg M. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54. Arthrose. Robert Koch Institut Berlin 2013
3. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 2002 Sep;18(7):730-4
4. Otte P. Der Arthrose-Prozeß Gelenkerhaltung – Gefährdung – Destruktion Teil 1: Osteochondrale Strukturen. Nürnberg: Novartis 2000
5. Michael JW, Schlüter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int*. 2010 Mar;107(9):152-62
6. Steadman JR, Miller BS, Karas SG, Schlegel TF, Briggs KK, Hawkins RJ. The microfracture technique in the treatment of full-thickness chondral lesions of the knee in National Football League players. *J Knee Surg*. 2003 Apr;16(2):83-6
7. Zantop T, Petersen W. Arthroscopic implantation of a matrix to cover large chondral defect during microfracture. *Arthroscopy*. 2009 Nov;25(11):1354-60
8. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*. 2003;81(9):646-56
9. Hackenbroch MH Periphere Arthrosen. In: Bischoff HP, Heisel J, Locher H (Hrsg) Praxis der konservativen Orthopädie. Thieme 2009, Stuttgart
10. van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis*. 1989 Apr;48(4):271-80
11. Hannan MT, Felson DT, Pincus T Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 2000; 27: 1513–17.
12. Hackenbroch MH Arthrosen. Georg Thieme Verlag 2002.
13. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage Part I: Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg* 1997; 79-A: 612–32.

14. Junqueira, Carneiro, Kelley Histologie 5. Auflage Seite 84- 89
15. Lewandowski KU, Ekkernkamp A, Dávid A, Muhr G, Schollmeier G. Classification of articular cartilage lesions of the knee at arthroscopy. *Am J Knee Surg.* 1996 Summer;9(3):121-8
16. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16: 494–501.
17. Niethard FU, Pfeil J. *Duale Reihe Orthopädie* 5. Auflage Thieme 2005 S188-190
18. Pendleton A, Arden N, Dougados M, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Cluzeau F, Cooper C, Dieppe PA, Günther KP, Hauselmann HJ, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis PM, Leeb B, Lequesne M, Lohmander S, Mazieres B, Mola EM, Pavelka K, Serni U, Swoboda B, Verbruggen AA, Weseloh G, Zimmermann-Gorska I. EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis: report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 2000 Dec;59(12):936-44
19. Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH, Hollingsworth JC, Ashton CM, Wray NP. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2002 Jul 11;347(2):81-8
20. Weigel B, Nehrlich ML. *Praxisbuch Unfallchirurgie* 2. Auflage Springer Seite 639-643
21. Weigel B, Nehrlich ML. *Praxisbuch Unfallchirurgie* 2. Auflage Springer Seite 636-638
22. Patrascu JM, Freymann U, Kaps C, Poenaru DV Repair of a post-traumatic cartilage defect with a cell-free polymer-based cartilage implant: a follow-up at two years by MRI and histological review. *JBJS* 2010 92(8):1160–1163
23. Lee YH, Suzer F, Thermann H. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis in the Knee: A Review. *Cartilage.* 2014 Jul;5(3):145-53
24. Skalak R, Fox CF. *Tissue engineering: proceedings of a workshop, held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988.* New York: Liss, 1988, p. 343
25. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998 Aug 3;33(1-2):165-182
26. Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittlinger M, Kaps C. Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials.* 2007 Dec;28(36):5570-80
27. Erggelet C, Endres M, Neumann K, Morawietz L, Ringe J, Haberstroh K, Sittlinger M, Kaps C. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *J Orthop Res.* 2009 Oct;27(10):1353-60

28. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7
29. Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*. 2003 Mar;26(3):125-31
30. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5
31. Neumann K, Dehne T, Endres M, Erggelet C, Kaps C, Ringe J, Sittlinger M. Chondrogenic differentiation capacity of human mesenchymal progenitor cells derived from subchondral cortico-spongious bone. *J Orthop Res*. 2008 Nov;26(11):1449-56
32. McNickle AG, Provencher MT, Cole BJ. Overview of existing cartilage repair technology. *Sports Med Arthrosc*. 2008 Dec;16(4):196-201
33. Krüger JP, Ketzmar AK, Endres M, Pruss A, Siclari A, Kaps C. Human platelet-rich plasma induces chondrogenic differentiation of subchondral progenitor cells in polyglycolic acid-hyaluronan scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 May;102(4):681-92
34. Kaul G, Cucchiari M, Remberger K, Kohn D, Madry H. Failed cartilage repair for early osteoarthritis defects: a biochemical, histological and immunohistochemical analysis of the repair tissue after treatment with marrow-stimulation techniques. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012 Nov;20(11):2315-24
35. Feld M, Hescheler J. Stammzellen: Potente Zellen. *Spektrum der Wissenschaft*, Mai 2003, S. 66–73
36. Koolman J, Röhm KH. Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4. Auflage. Thieme 2009
37. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005 May 11;21(3):389-95
38. Welsch U. Sobotta Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer, München 2002
39. Ayad S, Boot-Hanford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA. The Extracellular Matrix. Facts Book. Academic Press 1998
40. Matsumoto K, Shionyu M, Go M, Shimizu K, Shinomura T, Kimata K, Watanabe H. Distinct interaction of versican/Pg-M with hyaluronan and link protein. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):41205-12

41. Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lawler J. Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics*. 1994 Dec;24(3):435-9
42. Gundberg CM, Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Osteocalcin: isolation, characterization, and detection. *Methods Enzymol*. 1984;107:516-44
43. Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ. Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol*. 2005 Sep 16;4:14
44. Karp G. *Molekulare Zellbiologie*. 4. Auflage. Springer 2005
45. Hulpiau P, van Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Feb;41(2):349-69
46. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87
47. Christen Ph, Jaussi R. *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. Springer, 2004
48. Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, D Buckley C, Bühring HJ, Clark G, Engel P, Fox D, Jin BQ, Macardle PJ, Malavasi F, Mason D, Stockinger H, Yang X. CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods*. 2007 Jan 30;319(1-2):1-5
49. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood*. 1989 Jan;73(1):284-9
50. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci*. 2008 Nov 15;121(Pt 22):3683-92
51. Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, Wohlgemuth R. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med*. 2008 Feb;14(2):181-7
52. Thomson LF, Ruedi JM, Glass A, Moldenhauer G, Moller P, Low MG, Klemens MR, Massaia M, Lucas AH. Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens*. 1990 Jan;35(1):9-19
53. Ades EW, Zwerner RK, Acton RT, Balch CM. Isolation and partial characterization of the human homologue of Thy-1. *J Exp Med*. 1980 Feb 1;151(2):400-6
54. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992 Sep 25;267(27):19027-30

55. Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, Marquardt H, Neubauer M, Pesando JM, Francke U, et al. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med.* 1995 Jun 1;181(6):2213-20
56. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy.* 2003 May-Jun;19(5):477-84
57. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells.* 2003;21(6):681-93
58. Aigner T, Söder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Jul;3(7):391-9
59. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):223
60. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Mar;46(3):704-13
61. Dudics V, Kunstár A, Kovács J, Lakatos T, Géher P, Gömör B, Monostori E, Uher F. Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: measurements in a microculture system. *Cells Tissues Organs.* 2009;189(5):307-16
62. Rüter B, Grace B, Seitz O, Seifried E, Henschler R. Induction and detection of human mesenchymal stem cell migration in the 48-well reusable transwell assay. *Stem Cells Dev.* 2005 Apr;14(2):231-5
63. Mishima Y, Lotz M. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2008 Oct;26(10):1407-12
64. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol.* 1998 Jul;51(7):506-11
65. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, Sittlinger M. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007 May 1;101(1):135-46

66. Kalwitz G, Andreas K, Endres M, Neumann K, Notter M, Ringe J, Sittinger M, Kaps C. Chemokine profile of human serum from whole blood: migratory effects of CXCL-10 and CXCL-11 on human mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res.* 2010 Apr;51(2):113-22
67. Ullah M, Eucker J, Sittinger M, Ringe J. Mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiated and dedifferentiated progeny express chemokine receptor CCR9 and chemotactically migrate toward CCL25 or serum. *Stem Cell Res Ther.* 2013 Aug 19;4(4):99
68. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. 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.* 2001 Jul 3
69. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002 Mar;46(3):704-13
70. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro JM, Borojevic R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. *PLoS One.* 2014 Aug 12;9(8):e104662
71. Krüger JP, Endres M, Neumann K, Stuhlmüller B, Morawietz L, Häupl T, Kaps C. Chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells is affected by synovial fluid from donors with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *J Orthop Surg Res.* 2012 Mar 13;7:10
72. Chua KH, Zaman Wan Safwani WK, Hamid AA, Shuhup SK, Mohd Haflah NH, Mohd Yahaya NH. Retropatellar fat pad-derived stem cells from older osteoarthritic patients have lesser differentiation capacity and expression of stemness genes. *Cytotherapy.* 2014 May;16(5):599-611
73. Richter W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med.* 2009 Oct;266(4):390-405
74. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res.* 2002 Sep;20(5):1060-9
75. von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K, Stöss H. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.* 1992 Jul;35(7):806-11

76. van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Mar;20(3):223-32
77. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Dec;17(12):1539-45
78. Cecil DL, Johnson K, Rediske J, Lotz M, Schmidt AM, Terkeltaub R. Inflammation-induced chondrocyte hypertrophy is driven by receptor for advanced glycation end products. *J Immunol*. 2005 Dec 15;175(12):8296-302
79. He Y, Siebuhr AS, Brandt-Hansen NU, Wang J, Su D, Zheng Q, Simonsen O, Petersen KK, Arendt-Nielsen L, Eskehave T, Hoeck HC, Karsdal MA, Bay-Jensen AC. Type X collagen levels are elevated in serum from human osteoarthritis patients and associated with biomarkers of cartilage degradation and inflammation. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014 Sep 22;15:309
80. Gomoll AH. Microfracture and augments. *J Knee Surg*. 2012 Mar;25(1):9-15
81. Chen S, Fu P, Cong R, Wu H, Pei M. Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration. *Genes Dis*. 2015 Mar 1;2(1):76-95
82. Bornes TD, Adesida AB, Jomha NM. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic articular cartilage defects: a comprehensive review. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(5):432
83. Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter MW, Lehman AD, Ding L, Buckwalter JA, Martin JA. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum*. 2012 Nov;64(11):3626-37
84. Yu Y, Brouillette MJ, Seol D, Zheng H, Buckwalter JA, Martin JA. Use of recombinant human stromal cell-derived factor 1 α -loaded fibrin/hyaluronic acid hydrogel networks to achieve functional repair of full-thickness bovine articular cartilage via homing of chondrogenic progenitor cells. *Arthritis Rheumatol*. 2015 May;67(5):1274-85
85. Dehne T, Karlsson C, Ringe J, Sittlinger M, Lindahl A. Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):R133
86. de Windt TS, Saris DB, Slaper-Cortenbach IC, Van Rijen MH, Gawlitta D, Creemers L, de Weger RA, Dhert W, Vonk LA. Direct cell-cell contact with chondrocytes is a key mechanism in multipotent mesenchymal stromal cell-mediated chondrogenesis. *Tissue Eng Part A*. 2015 Jul 13

87. Krüger JP, Endres M, Neumann K, Stuhlmüller B, Morawietz L, Häupl T, Kaps C. Chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells is affected by synovial fluid from donors with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *J Orthop Surg Res.* 2012 Mar 13;7:10
88. Siclari A, Mascaro G, Gentili C, Cancedda R, Boux E. A Cell-free Scaffold-based Cartilage Repair Provides Improved Function Hyaline-like Repair at One year. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2012;470(3):910-919
89. Siclari A, Mascaro G, Kaps C, Boux E. A 5-Year Follow-Up After Cartilage Repair in the Knee Using a Platelet-Rich Plasma-Immersed Polymer-Based Implant. *The Open Orthopaedics Journal.* 2014 Oct 17;8:346-54
90. Bark S, Piontek T, Behrens P, Mkalaluh S, Varoga D, Gille J. Enhanced microfracture techniques in cartilage knee surgery: Fact or fiction? *World J Orthop.* 2014 Sep 18;5(4):444-9
91. Eldracher M, Orth P, Cucchiaroni M, Pape D, Madry H. Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. *Am J Sports Med.* 2014 Nov;42(11):2741-50
92. Benthien JP, Behrens P. Nanofractured autologous matrixinduced chondrogenesis (NAMIC©) - Further development of collagen membrane aided chondrogenesis combined with subchondral needling: A technical note. *Knee.* 2015 Jul 16
93. Pascarella A, Ciatti R, Pascarella F, Latte C, Di Salvatore MG, Liguori L, Iannella G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee joint using a modified AMIC technique. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Apr;18(4):509-13
94. Gille J, Behrens P, Volpi P, et al. Outcome of Autologous Matrix Induced Chondrogenesis (AMIC) in cartilage knee surgery: data of the AMIC Registry. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery.* 2013;133(1):87-93. doi:10.1007/s00402-012-1621-5.
95. Chen H, Sun J, Hoemann CD, Lascau-Coman V, Ouyang W, McKee MD, Shive MS, Buschmann MD. Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *J Orthop Res.* 2009 Nov;27(11):1432-8
96. Lee YHD, Suzer F, Thermann H. Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis in the Knee: A Review. *Cartilage.* 2014;5(3):145-153

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Lebenszeitprävalenz der Arthrose Quelle: GEDA 2010 Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 54 Arthrose.....	6
Abbildung 2: Schematischer Vergleich gesundes Gelenk (A) und arthrotisches Gelenk (B) Quelle: Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 54 Arthrose	7
Abbildung 3: Fließschema zur gelenkerhaltenden Versorgung Quelle: Madry H, Grün UW, Knutsen G: Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. Dtsch Arztebl Int 2011; 108(40): 669–77	10
Abbildung 4: Durchführung der Pridie-Bohrung und der Mikrofrakturierung Quelle: Der Arthrose- Prozess Teil 2 Gelenkdeformation: Biomechanik	11
Abbildung 5: Für regenerative Medizin verfügbare Stamm- und Vorläuferzellen Quelle: Cell types available for regenerative medicine applications Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles Mark R. Placzek, I-Ming Chung, Hugo M. Macedo, Siti Ismail, Teresa Mortera Blanco, Mayasari Lim, Jae Min Cha, Iliana Fauzi, Yunyi Kang, David C. L. Yeo, Chi Yip Joan Ma, Julia M. Polak, Nicki Panoskaltis and Athanasios Mantalaris.....	14
Abbildung 6: Die oaMPC zeigen ein spindelförmiges Erscheinungsbild (A) mit einem wirbelartigen Muster (B).....	31
Abbildung 7: Diagramm der absoluten Zellzahl im Verhältnis zur Kultivierungszeit zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsrate μ ; die durchschnittliche Wachstumsrate lag bei $0,204 \pm 0,015$ pro Tag.....	32
Abbildung 8: Die flowzytometrische Auswertung von Zelloberflächenantigenen exemplarisch von einem Spender. Die oaMPC zeigen sich positiv für die Antigene CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166 sowie negativ für CD14, CD34 und CD45	33
Abbildung 9: Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden wandern oaMPC durch die Poren (A) und können nach der Färbung (B) ausgezählt werden.....	33
Abbildung 10: Im Vergleich zu oaMPC die mit 0,1% Humanserum stimuliert wurden, zeigen oaMPC die mit 5% oder 10% Serum stimuliert wurden eine statistisch signifikante Erhöhung (#p< 0,01)	34
Abbildung 11: Die mesenchymalen Vorläuferzellen zeigten nach Induktion mit 5% und 10% Humanserum chemotaktische Aktivität.....	35
Abbildung 12: Safranin O gefärbter nativer hyaliner Knorpel als Positivkontrolle. Proteoglykane in Rot, Zellkerne in Grün dargestellt	35
Abbildung 13: Safranin O gefärbte Histologieschnitte von induzierten oaMPC am Tag 21 mit ausgeprägter Rotfärbung der Proteoglykane. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)	36

Abbildung 14: Nicht induzierte oaMPC am Tag 21. Färbung Safranin O mit geringen Proteoglykannachweis. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C).....	36
Abbildung 15: Alcianblau gefärbter nativer hyaliner Knorpel als Positivkontrolle. Proteoglykane in Blau, Zellkerne in rötlich-lila dargestellt	37
Abbildung 16: Alcianblau gefärbte Kryoschnitte von Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C) am Tag 0 der Kultivierung.....	37
Abbildung 17: Alcianblau gefärbte Kryoschnitte am Tag 7 bei nicht induzierten oaMPC. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)	37
Abbildung 18: Alcianblau Färbung von induzierten oaMPC am Tag 7. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C).....	38
Abbildung 19: TGF- β 3 induzierte Zellen zeigten in den Alcianblau-Schnitten von Tag 7 auf Tag 14 einen starken Anstieg an Proteoglykanen. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C).....	38
Abbildung 20: Tag 21 der chondrogen induzierten oaMPC nach Alcianblau Färbung. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)	38
Abbildung 21: Alcianblau Färbung der Kryoschnitte von nicht induzierten oaMPC an Tag 14 der Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C) und an Tag 21 (Spender 1(D), Spender 2 (E), Spender 3 (F)).....	39
Abbildung 22: Verhältnis von positiv gefärbten Pixeln zur Gesamtpixelzahl in Prozent. Alle induzierten Schnitte zeigten einen signifikanten Anstieg zu Tag 0 ($p_{ind} < 0,01$) und zu den nicht-induzierten Zellen ($p_{non} < 0,01$)	40
Abbildung 23: Immunhistochemischer Kollagen Typ II Nachweis technische Kontrolle (A) und Positivkontrolle (B).....	40
Abbildung 24: TGF- β 3 induzierte oaMPC zeigen immunhistochemisch einen deutlichen Anstieg der Färbung von Tag 7 bis Tag 21 und damit eine Zunahme an Kollagen Typ II.....	41
Abbildung 25: Nicht induzierte oaMPC zeigen immunhistochemisch keine Färbungszunahme als Mangel an Proteoglykanen und Kollagen Typ II.....	41
Abbildung 26: Bereits früh lassen sich Lipidvakuolen mit bloßem Auge erkennen Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C). In der Oil Red O Färbung zeigen sich die Lipidvakuolen nach 21 Tagen deutlich Rot angefärbt. Spender 1(D), Spender 2 (E), Spender 3 (F)	42
Abbildung 27: Oil Red O gefärbte Negativkontrollen der Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)	42
Abbildung 28: Die osteogen induzierten oaMPC zeigen eine Braunfärbung der Matrix nach von Kossa Färbung als beginnendes Zeichen der Kalzifizierung. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C)	43

Abbildung 29: Nicht osteogen induzierte oaMPC ohne Kalzifizierungsnachweis. Spender 1(A), Spender 2 (B), Spender 3 (C).....	43
Abbildung 30: Genexpressionsanalyse aller Spender; Kollagen Typ II und Aggrekan mit signifikanter Erhöhung der relativer Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC (#p<0,01).....	44
Abbildung 31: Genexpressionsanalyse aller Spender; Linkprotein und COMP mit signifikanter Erhöhung der Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC (#p<0,01)	44
Abbildung 32: Genexpressionsanalyse aller Spender; Kollagen Typ I und Kollagen Typ IX mit signifikanter Erhöhung der Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC (#p<0,01)	45
Abbildung 33: Genexpressionsanalyse aller Spender; Osteocalcin und FABP-4 mit signifikanter Erhöhung der Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC (#p<0,01)	46
Abbildung 34: Genexpressionsanalyse aller Spender; Kollagen Typ X mit signifikanter Erhöhung der Expression in induzierten oaMPC im Vergleich zu nicht induzierten oaMPC (#p<0,01)	46
Abbildung 35: Zum Ausschluss der Hypertrophie durchgeführte Oil Red O- und von Kossa-Färbung bei chondrogen induzierten oaMPC Zellpelletkulturen	47

10 Abkürzungsverzeichnis

ACT	Autologe Chondrozyten Transplantation
ACE	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALCAM	Activated leucocyte cell adhesion molecule
AMP	Adenosinmonophosphate
BGLAP	Bone γ -carboxylglutamic Acid-containing Protein
BMI	Body Mass Index
C2M	matrix metalloproteinase-derived fragments of type II collagen
CAM	Cell Adhesion Molecule
CD	Cluster of Differentiation
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CRP	C-reaktives Protein
DME	Dulbecco`s Modified Eagle`s
DMOAD	disease modifying osteoarthritis drug
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
ECM	Extra Cellular Matrix
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
FAB	Fragment Antigen Binding
FABP4	Fatty Acid Binding Protein
FACS	Flourescence-activated Cell Sorting
FITC	Flourescin Isothiocynat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
SYSADOA	symptomatic slow acting drugs in osteoarhrosis
HAPLN1	Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IBMX	3-isobutyl-1-methyl-Xanthin
ICRS	International Cartilage Research Society
Ig	Immunglobuline
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite
MOCART	magnetic resonance observation of cartilagerepair tissue score
MPC	Mesenchymale Progenitor Cell
OA	Osteoarthrose

oaMPC	osteoarthrotic Mensenchymal Progenitor Cell
OCT	osteocondrale Transplantation
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythin
PPARG	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter Rezeptor Gamma
p-Wert	Signifikanzwert
SADOA	slow acting drugs in osteoarthritis
SH-2	Src-homology 2, Src = Sarcoma
SH-3	Src-homology 3
THY-1	Thymus Cell Antigen 1
TGF	Transforming growth factor

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe.

Rostock, den 20. August 2015

Andreas Eugen Enz

Danksagung

Lebenslauf