

Aus der Klinik für Orthopädische, Unfall- und
Wiederherstellungschirurgie, Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von Interleukin-10 und TNF α auf die chondrogene
Differenzierung der humanen mesenchymalen Stammzellen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michał Wojciech Jagielski

aus Stettin

Datum der Promotion: 04.09.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	- 5 -
2. Abstract.....	- 6 -
2.1 Englische Version.....	- 6 -
2.2 Deutsche Version	- 7 -
3. Einleitung	- 8 -
3.1 Mesenchymale Stammzellen.....	- 8 -
3.2 Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen.....	- 10 -
3.3 Chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen.....	- 10 -
3.4 Klinische Anwendung von mesenchymalen Stammzellen.....	- 11 -
3.5 Gelenkknorpel	- 13 -
3.6 Arthrose und deren Behandlungsmöglichkeiten	- 15 -
3.7 Interleukin 10.....	- 18 -
3.8 TNF α	- 19 -
3.9 Fragestellung.....	- 20 -
4. Material	- 22 -
4.1 Chemikalien.....	- 22 -
4.2 Verbrauchsmaterialien.....	- 24 -
4.3 Geräte	- 25 -
4.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	- 26 -
4.5 Antikörper für die Immunhistologie	- 27 -
4.6 Primer.....	- 28 -
4.7 Kits	- 28 -
4.8 Medien.....	- 29 -

5. Methoden.....	- 31 -
5.1 MSC – Isolierung.....	- 31 -
5.1.1 Dichtegradientenzentrifugation	- 31 -
5.2 MSC – Kultivierung.....	- 32 -
5.3 Durchflusszytometrie	- 33 -
5.4 Multipotenz	- 33 -
5.4.1 Adipogene Differenzierung	- 34 -
5.4.2 Osteogene Differenzierung	- 34 -
5.5 MSC – Massenkulturen	- 34 -
5.6 Histologische Färbungen.....	- 35 -
5.6.1 Hämatoxylin und Eosin	- 35 -
5.6.2 Alcianblau	- 35 -
5.6.3 Von Kossa	- 36 -
5.6.4 Immunhistologie.....	- 36 -
5.7 Genexpressionsanalysen	- 36 -
5.7.1 RNA – Isolierung.....	- 37 -
5.7.2 RNA – Konzentrationsmessung	- 37 -
5.7.3 cDNA – Synthese.....	- 38 -
5.7.4 Echtzeit – Polymerase – Kettenreaktion (RT PCR).....	- 38 -
5.7.5 Effizienzbestimmung.....	- 39 -
5.8 Statistik.....	- 39 -
5.9 Richtlinien.....	- 39 -

6.	Ergebnisse	- 40 -
6.1	MSC – Charakterisierung	- 40 -
6.2	Multipotenznachweis	- 43 -
6.3	IL-10 – Rezeptor und IL-10 Expression	- 45 -
6.4	STAT1 und STAT3 Expression	- 46 -
6.5	Struktur der 3D – Kulturen	- 47 -
6.5.1	Makroskopische Struktur	- 47 -
6.5.2	Mikroskopische Struktur.....	- 48 -
6.6	Genexpressionsanalyse	- 49 -
6.6.1	Expression von Kollagen Typ II.....	- 49 -
6.6.2	Expression von Aggrekan	- 50 -
6.6.3	Expression von sox9.....	- 51 -
6.6.4	Expression von TNF α	- 52 -
6.6.5	Expression von typischen Knorpelmarkern im Vergleich zu frisch isolierten Chondrozyten.....	- 53 -
7.	Diskussion.....	- 55 -
8.	Schlussfolgerung und Ausblick	- 62 -
9.	Abkürzungsverzeichnis	- 64 -
10.	Literaturverzeichnis.....	- 65 -
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	- 73 -
12.	Curriculum vitae.....	- 75 -
13.	Publikationsliste	- 77 -
13.1	Publikationen.....	- 77 -
13.2	Posterbeiträge	- 77 -
14.	Danksagung.....	- 78 -

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Native MSC isoliert aus der Femurspongiosa in der 5. Passage.....	- 8 -
Abbildung 2: Entwicklung und Differenzierung der MSCs	- 9 -
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Gelenkknorpels.....	- 14 -
Abbildung 4: Konventionelle radiologische Aufnahme des Beckens	- 17 -
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Methodik dieser Doktorarbeit.	- 21 -
Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse der MSCs.	- 41 -
Abbildung 7: Immunhistologische Charakterisierung der MSC.....	- 42 -
Abbildung 8: Multipotenznachweis.	- 44 -
Abbildung 9: IL-10- und IL-10-Rezeptorexpression	- 45 -
Abbildung 10: STAT1 und STAT3 Expression.....	- 46 -
Abbildung 11: Repräsentative 3D-Kulturen.....	- 47 -
Abbildung 12: Histologie und immunhistologische Färbung der MSCs	- 48 -
Abbildung 13: Relative Genexpression von Kollagen Typ II	- 50 -
Abbildung 14: Relative Genexpression von Aggrekan.....	- 51 -
Abbildung 15: Relative Genexpression von sox9	- 52 -
Abbildung 16: Relative Genexpression von TNF α	- 53 -
Abbildung 17: Relative Genexpressionsanalysen der MSCs in 3D- und PGA-Kultur im Vergleich zu frisch isolierten Chondrozyten.....	- 54 -

2. Abstract

2.1 Englische Version

Chondrogenic differentiated mesenchymal stromal cells (MSCs) are a promising cell source for articular cartilage repair. Interleukin (IL)-10 is believed to be an anti-inflammatory cytokine and its role in MSCs is still unknown. This study was undertaken to determine the efficacy of a scaffold-free three-dimensional (3D) culture system for chondrogenic MSCs differentiation and to assess the effect of IL-10 and Tumor Necrosis Factor α (TNF) on chondrogenesis by MSCs in the 3D high-density (H-D) culture.

MSCs were isolated from the bone marrow of the femur spongiosa. Subsequently they were characterized using a set of typical cell surface markers, tested for multipotency and introduced in scaffold-free H-D cultures for chondrogenic differentiation. A part of the isolated MSCs was also introduced in a monolayer culture to determine whether they express the IL-10 receptor (R), or IL-10. H-D cultures were stimulated with recombinant IL-10, TNF α , TNF α + IL-10 or remained untreated as controls. Gene and protein expression of type II collagen, aggrecan, sox9 and TNF α were examined.

MSCs expressed typical cell surface markers, revealed multipotency and expressed IL-10R as well as IL-10. IL-10 increased the expression of STAT3. The H-D cultures maintained their form through the whole experiment. Chondrogenic differentiated cells expressed cartilage-specific markers.

IL-10 and/or TNF α did not impair the chondrogenic differentiation of MSCs. Moreover, in most of the investigated samples, despite not reaching the significance level, IL-10 had a stimulatory effect on the type II collagen, aggrecan and TNF α expression when compared with the respective controls. IL-10 and TNF α seem to influence chondrogenesis. These results could facilitate the development of novel therapeutical strategies for the treatment of cartilage defects especially under inflammatory conditions like osteoarthritis.

2.2 Deutsche Version

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) als Vorläuferzellen der Chondrozyten haben ein großes Potenzial in der Entwicklung neuartiger Therapieansätze in der regenerativen Medizin. Interleukin (IL)-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, dessen Rolle in MSCs noch unerforscht bleibt. Diese Arbeit wurde durchgeführt, einerseits zur Untersuchung eines Scaffold-freien dreidimensionalen (3D) Kultursystems und andererseits zur Erforschung des Einflusses des IL-10 und Tumornekrosefaktor (TNF) α auf die chondrogene Differenzierung der MSCs.

MSCs wurden aus dem Knochenmark der Spongiosa von Femurköpfen isoliert. Nach der Isolierung erfolgten Untersuchungen des Oberflächenprotein-Expressionsmusters, der Multipotenz und der Expression von IL-10-Rezeptor (R) und IL-10. Nach der Kultivierung wurden die Scaffold-freien 3D-Kulturen angefertigt. Nach 7-tägiger chondrogener Differenzierung wurden die Kulturen mit IL-10, TNF α , TNF α + IL-10 stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte und nicht differenzierte 3D-Kulturen. Gen- und Proteinexpression von Kollagen Typ II, Aggrekan, sox9 und TNF α wurden untersucht.

MSCs exprimierten die typischen Oberflächenrezeptoren, IL-10R und IL-10. Eine Multipotenz der isolierten Zellen konnte nachgewiesen werden. IL-10 induzierte STAT3-Expression. Die 3D-Kulturen behielten während der gesamten Kulturdauer ihre ursprüngliche Form. Die chondrogen differenzierten Zellen exprimierten die typischen Knorpelmarker.

IL-10 und/oder TNF α haben die chondrogene Differenzierung der MSCs nicht inhibiert. Obwohl der Effekt nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle war, hatte IL-10 eine leicht stimulierende Wirkung auf die Expression von Kollagen Typ II, Aggrekan, sox9 und TNF α . Ferner, schienen IL-10 und TNF α eine Rolle in der Chondrogenese zu spielen was eine Möglichkeit bei Entwicklung neuartiger Therapien von Knorpeldefekten bieten könnte insbesondere im Hinblick auf ein Entzündungsmilieu bei Arthrose.

3. Einleitung

3.1 Mesenchymale Stammzellen

Das Mesenchym bildet ein embryonales Stütz- und Füllgewebe aus differenzierungsfähigen Vorläuferzellen. Wie der Name bereits impliziert, sind mesenchymale Stammzellen (MSCs) nichts anderes als pluripotente, spindelförmige Vorläuferzellen (Abb.1). Sie besitzen ein hohes Proliferations- sowie Differenzierungspotenzial und sind in der Lage sich unter anderem in Osteoblasten, Chondroblasten, Myozyten, Tendozyten oder Adipozyten zu differenzieren. Die MSCs können aus dem Knochenmark durch das Blutsystem in die entsprechenden Organe migrieren. Die Migration wird durch multiple Stimulationsfaktoren insbesondere durch Zytokine induziert [1]. In verschiedenen mesodermalen Geweben wie Fettgewebe, Muskeln oder Knochen werden Depots von Stammzellen detektiert [2-5].

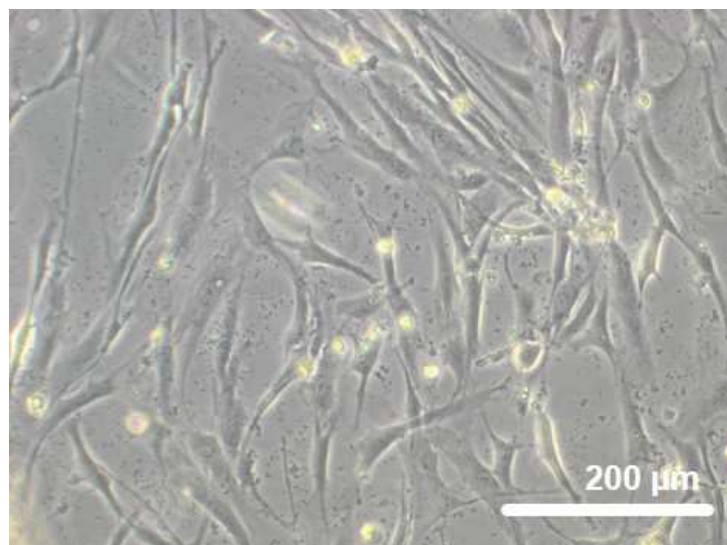


Abbildung 1: Native MSCs isoliert aus der Femurspongiosa in der 5. Passage. Zweidimensionale (2D) Kultur in einer Petrischale.

Signifikante Unterschiede in Proliferations- und Differenzierungspotential wurden zwischen den MSCs unterschiedlicher Herkunft beschrieben. Insbesondere MSCs aus dem Knochenmark zeichnen sich durch eine sehr ausgeprägte Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit aus [6]. Die MSCs werden derzeit für Forschungszwecke oder zur Therapie am häufigsten aus dem Knochenmark gewonnen. Die Methode ist einfach und für den Patienten auch risikoarm. Das Knochenmark kann mittels einfacher Punktion

aus dem spongiösen Knochen des Beckenkamms aspiriert werden [7]. Der Eingriff kann sogar in Lokalanästhesie oder in einer Analgosedierung erfolgen. Das Knochenmark ist ein gut organisiertes Organ, was in der Lage ist die Vorläuferzellen in einem undifferenzierten Stadium zu halten [1]. Das Knochenmark stellt zwar ein großes Reservoir an Stammzellen dar, es ist aber auch reich an hämatopoetischen Stammzellen oder Blutzellen [3, 8]. Im Knochenmark befindet sich nur eine mesenchymale Stammzelle pro 100 000 Zellen [9]. Für die Gewinnung von MSCs Kulturen ist entscheidend die MSCs vollständig von anderen Bestandteilen des Knochenmarks zu trennen. Im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen oder Leukozyten sind die MSCs plastikadhärent, d.h. sie besiedeln die Kunststoffoberflächen der Kulturschalen. Es gibt zwar kein einzelnes MSCs spezifisches Oberflächenprotein (CD, cluster of differentiation), aber dafür ein für die MSCs typisches CD-Muster. Die MSCs exprimieren unter anderem CD29, CD44 und CD90 und sind im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen CD34 negativ [10-13].

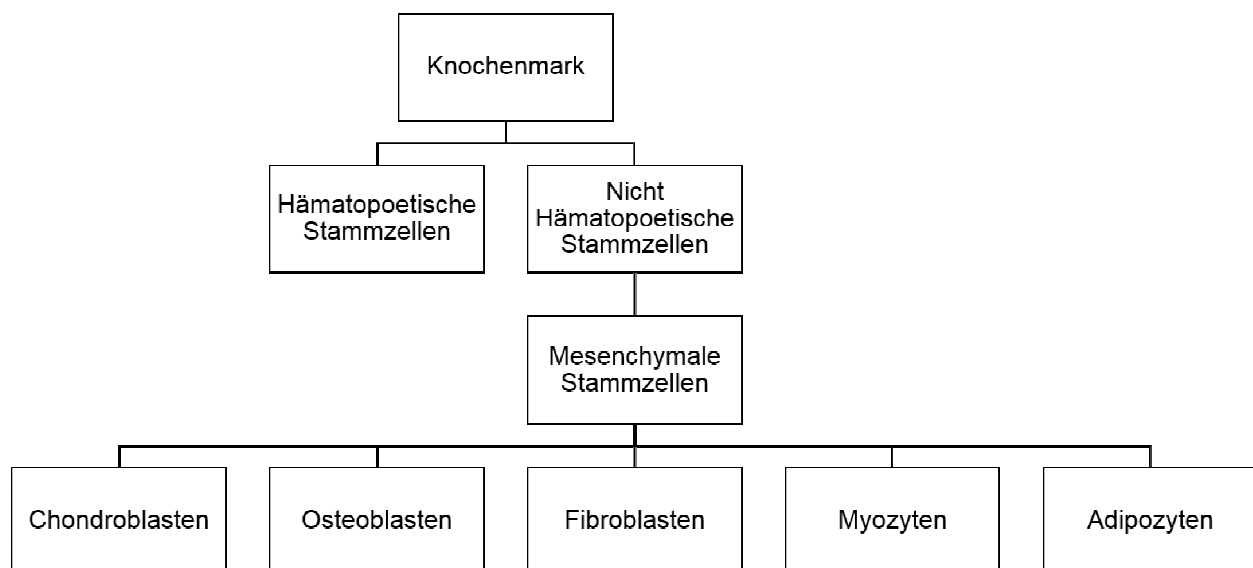


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung und Differenzierung der Stammzellen aus dem Knochenmark [1, 2].

3.2 Isolierung und Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen

Die MSCs lassen sich aus fast allen Gewebetypen des Bewegungs- und Stützapparates gewinnen. Bei der Isolierung der MSCs aus dem Gewebe müssen zumeist spezifische Proteasen angewendet werden. Dadurch ist die Gewinnung der MSCs aus dem Fett- oder dem Muskelgewebe ein relativ aufwendiger und langer Prozess. Darüber hinaus ist die Anzahl der gewonnenen Zellen gering [14, 15]. Im Gegensatz dazu ist die Isolierung von MSCs aus dem Knochenmark durch die geringe Kohärenz dieses Gewebes einfacher. Daher reicht meistens eine Dichtengradientenzentrifugation der aus der Spongiosa herausgewaschenen Zellpopulationen aus um eine entsprechende Menge an MSCs zu gewinnen. Die so gewonnene Zellmasse wird in entsprechenden Kulturflaschen ausgesät. Dank der Plastikadhärenz der MSCs werden andere Zelltypen des Knochenmarks bei einem Kulturmediumwechsel entfernt [2, 14]. Eine weitere gute Quelle für MSCs bildet der spongiöse Knochen (zum Beispiel: Femurkopf). Mithilfe einer modifizierten Dichtegradientenzentrifugation lassen sich schnell und einfach ausreichende Mengen an MSCs für Forschungszwecke gewinnen. Dabei können andere Zellen und Gewebsreste durch die Bindung an ein hydrophiles Polymer von den MSCs während der Zentrifugation getrennt werden [2, 9, 16]. Eine weitere Differenzierung der isolierten MSCs zu Adipozyten, Osteozyten oder Chondrozyten kann durch gezielte und adäquate Stimulation mit zum Beispiel Zytokinen und anderen Mediatoren erreicht werden [2]. Diese Plastizität weckte das Interesse an diesen Zellen für den Gewebeersatz.

3.3 Chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen

Die MSCs spielen in der Regeneration des verletzten Gewebes eine entscheidende Rolle. Bei einem traumatischen Gelenkknorpeldefekt kommt es zur verletzungsinduzierten Migration und Differenzierung von MSCs. Leider ist die gebildete neue Gewebeschicht reich an Kollagen Typ I wie bei einem Faserknorpel und hat dadurch andere biochemische und biomechanische Eigenschaften als hyaliner Knorpel der hauptsächlich aus Kollagen Typ II besteht. Dieser Knorpel stellt eine Art Narbengewebe in der Gelenkfläche dar und unterliegt einer relativ schnellen Degeneration [17, 18]. In *in vitro* Versuchen kann durch spezifische Stimulation eine adipogene, osteogene oder chondrogene Differenzierung der MSCs induziert werden [2]. Die Möglichkeit der präzisen Steuerung der MSC-Differenzierung könnte ein

Meilenstein in der regenerativen Medizin sein. Es wird beschrieben, dass die Chondrogenese mittels Zytokinen der Transforming Growth Factor (TGF) β -Familie gesteuert wird. Eine Stimulation mit TGF- β 1 oder - β 3 führt bei den MSCs zur chondrogenen Differenzierung. Die MSCs produzieren signifikant höhere Mengen an Kollagen Typ II und Aggrekan unter Addition von TGF- β 1 als ohne diese. Letztere sind typische Marker der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels [19-22]. Bei der chondrogenen Differenzierung findet eine Induktion von STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) statt. STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der wichtig für die chondrogene Differenzierung ist [22]. STAT3 ist essentiell für alle bekannten Funktionen des IL-10 und es moduliert über eine Zytokinbeeinflussung anti-inflammatorische, durch IL-10 gesteuerte Prozesse [23]. Darüber hinaus ist sox9 ein weiterer Transkriptionsfaktor, der zu der Genfamilie der Sry-related high-mobility-group box (sox) gehört und ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Chondrogenese spielt. Mutationen in sox9-Gen sind mit Missbildungen des Knochen- und Knorpelgewebes vergesellschaftet. Interessanterweise exprimieren die chondrogen stimulierten MSCs vermehrt sox9 [22, 24].

3.4 Klinische Anwendung von mesenchymalen Stammzellen

Das hohe Differenzierungs- und Proliferationspotential weckt ein großes Interesse an MSCs in der regenerativen Medizin. Bereits seit mehreren Jahren werden die hämatopoetischen Stammzellen in der Medizin bei hämatologischen Erkrankungen wie Leukämie erfolgreich angewandt [25-27]. Jedoch bleibt ihre Anwendung immer noch weit entfernt vom klinischen Alltag. In der kardiologischen Forschung wird versucht das Ausmaß der ischämischen Schädigung des Myokards nach einem Herzinfarkt mit Hilfe von MSCs zu beeinflussen. Bei einem Herzinfarkt kommt es zur Myokardischämie, was zur Nekrose und letzten Endes zur Fibrosierung der betroffenen Muskulatur führt. Es wurde vermutet, dass eine intravenöse Applikation von MSCs diesen Heilungsprozess des frisch geschädigten Myokards modellieren kann. Eine ähnliche Wirkung der MSCs wurde bei einem zerebralen Insult vermutet. Leider ist die Studienlage hierzu spärlich. In den klinischen Versuchen wurde kein signifikanter Einfluss auf die spätere Funktion dieser Organe festgestellt [28, 29]. Der regenerative Effekt einer intravenösen Applikation von MSCs wurde auch in klinischen Studien bei Patienten mit Multipler Sklerose untersucht. Diese Methode ist für Patienten risikoarm und einfach durchführbar. In dieser Pretest-Posttest-Design Interventionsstudie konnte eine

neuroprotektive Tendenz nach der Behandlung mit MSCs beobachtet werden, die Ergebnisse waren aber nicht signifikant [30]. In der Unfallchirurgie und Orthopädie wurde der Einfluss von Knochenmarkskonzentrat auf die Pseudarthrosenheilung untersucht. Pseudarthrose bezeichnet eine fehlende Frakturheilung nach mehr als 6 Monaten nach Trauma. Eine Applikation des Knochenmarks in eine Pseudarthrose scheint die Knochenheilung zu beschleunigen. Es wird vermutet, dass dabei die Konzentration an MSCs eine entscheidende Rolle spielt [31, 32]. Weiterhin ist ein Nutzen der MSCs in der Behandlung von Knorpeldefekten denkbar. Es existieren nur wenige Studien, die einen chondroinduktiven Effekt bei Gelenkapplikation von MSCs beschreiben [33, 34]. Die Studie von Orozco et al. implizierte das eine intraartikuläre Applikation von MSCs bei einer Kniearthrose zur Schmerzreduktion führen kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Jo et al. [35]. Bei fehlender Kontrollgruppe und geringer Probandenanzahl in den beiden Studien bleibt unklar, ob dabei ein Placeboeffekt stattgefunden hat. Jedoch entspricht die biochemische und biomechanische Qualität des regenerierten Gelenkknorpels nicht der ursprünglichen, gesunden Knorpelschicht [17]. Die MSCs besitzen zusätzlich noch immunmodulatorische Eigenschaften. Sie sind in der Lage B-Zellen über eine IL-10-Expression und T-Zell-Aktivierung zu inhibieren [36]. Dank einer Freisetzung von IL-10 und von Wachstumsfaktoren wie TGF oder Hepatocyte Growth Factor (HGF) können die MSCs eine lokale Immunreaktion beeinflussen und eine Entzündungsreaktion unterdrücken [37, 38]. Es wird auch eine trophische Wirkung auf die benachbarten Zellen durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren beschrieben [39]. Diese Eigenschaften könnten eine Abstoßungsreaktion von einem potentiellen Transplantat verhindern [40]. Eine gezielte Steuerung und Kontrolle der chondrogenen Differenzierung der MSCs könnte ein wichtiger Ansatzpunkt in der Behandlung von traumatischen und degenerativen Gelenkknorpelveränderungen bilden. Der unbefriedigende Heilungserfolg von Gelenkknorpeldefekten findet sich in seinem spezifischen Aufbau begründet.

3.5 Gelenkknorpel

Fast alle Gelenkflächen im menschlichen Körper werden vom hyalinen Knorpel überzogen. Der hyaline Knorpel unterscheidet sich vom Faserknorpel und elastischem Knorpel unter anderem in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) [41-43]. Der hyaline Gelenkknorpel besteht fast zu 90% aus ECM. Nur 10% der Masse bilden die Chondrozyten, die die ECM synthetisieren und ihre Proliferationsfähigkeit im reifen Knorpel verloren haben. In der ECM des hyalinen Knorpels befindet sich im Gegensatz zur anderen Knorpelformen hauptsächlich Kollagen Typ II und Aggrekan [44]. Kollagen Typ II ist ein spezifisches Strukturprotein des Knorpels, das fast nur von Chondrozyten produziert wird. Aggrekan, ebenfalls eine Knorpel-typische ECM-Komponente, ist ein großes Proteoglykan mit sehr hoher Wasserbindungskapazität. Eine Zonen-spezifische Verteilung, Ausrichtung und Konzentration dieser ECM-Komponenten im Knorpel ist für die Funktion von zentraler Bedeutung und kann bei der Heilung kaum wieder hergestellt werden. Der Knorpel kann in 4 Schichten gegliedert werden. Die oberflächliche, auch tangential Schicht genannt, mittlere, tiefe und kalzifizierte Schicht wie in der Abbildung 3 dargestellt. Diese Verteilung der ECM Komponenten im Gelenkknorpel, insbesondere die vielen negativen Ladungen des Aggrekans, erzeugt einen hohen osmotischen Druck, was zu einem gewünschten Wassereinstrom führt [44].

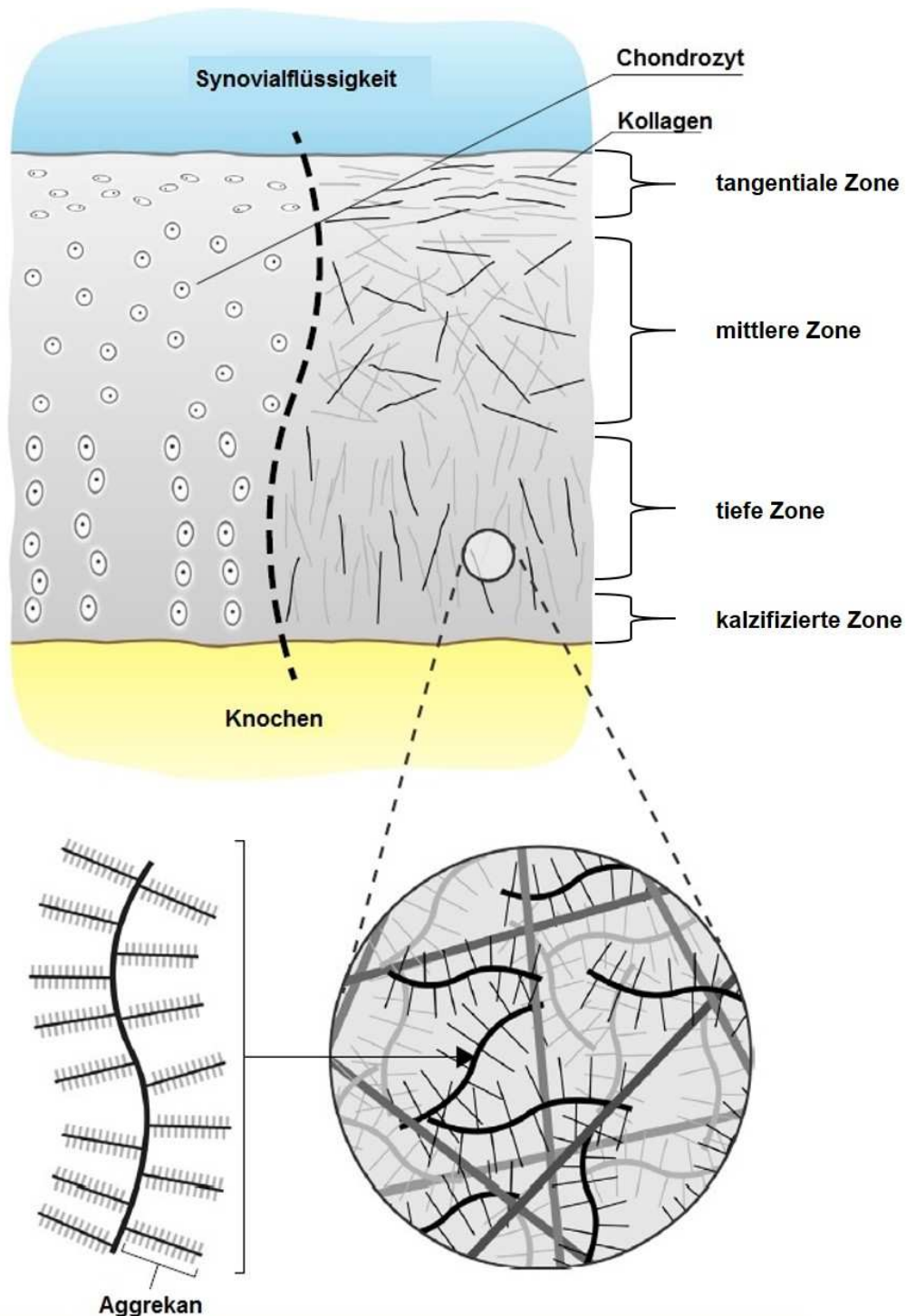


Abbildung 3: Eine modifizierte schematische Darstellung des Gelenkknorpels aus der Arbeit von Woodhouse et al 2015 [44]. In jeder Schicht ändert sich die Ausrichtung der Kollagenfibrillen. Je tiefer, desto geringer ist der Anteil an Kollagen Typ II und Aggrekan. In jeder Schicht ändert sich ebenfalls die Form, die Ausrichtung und die Synthesefähigkeit der Chondrozyten, In der Tangentialzone werden zusätzlich Lubricin und Decorin sezerniert, wichtige Proteine der Synovialflüssigkeit, die von den Synovialzellen der Synovialmembran freigesetzt wird [44].

Diese Zusammensetzung des Gelenkknorpels führt zu einer Belastungsstabilität aber gleichzeitig Gleitfähigkeit und Elastizität [43, 45]. Der hyaline Knorpel erlaubt nicht nur eine reibungslose Beweglichkeit des Gelenks, sondern dient auch als Schutz für die angrenzenden knöchernen Anteile. Es ist ein besonderes avaskuläres Gewebe und wird hauptsächlich von der Synovialflüssigkeit versorgt sowie Anteile der tiefen Schicht (unterhalb der Tidemark) durch Diffusion von Nährstoffen aus den Kapillaren des subchondralen Knochens. Eine regelmäßige Belastung und Entlastung der Gelenkfläche führt zur Diffusion der Synovialflüssigkeit und zur Versorgung der Chondrozyten. Der Knorpel ist jedoch gegenüber mechanischen und biochemischen Reizen sehr empfindlich. Bei übermäßiger insbesondere dauerhafter Belastung der Gelenkfläche kommt es zum vermehrten Austritt des Wassers aus dem Knorpel ohne ausreichenden Rückstrom in der Entlastungsphase, Degeneration des Aggrecans und Kollagens und zur Schädigung der Chondrozyten [44]. Eine Verletzung des Gelenks führt zum Anstieg von pro-inflammatorischen Zytokinen, die einen direkten und indirekten destruktiven Einfluss auf die Chondrozyten haben [45]. Die Chondrozyten besitzen nur eine begrenzte Regenerationsfähigkeit. Ortständige Chondrozyten können nach einer Knorpelverletzung keine vollständige Rekonstruktion der Gelenkfläche ermöglichen. Die Avaskularität und Aneuralität des Gelenkknorpels und die fehlende Proliferations- und Differenzierungsmöglichkeit der reifen Chondrozyten führen zu erheblichen Einschränkungen in der Regeneration des geschädigten Gelenkknorpels [44]. So können Gelenkknorpelverletzungen langfristig zur Arthrose führen [46].

3.6 Arthrose und deren Behandlungsmöglichkeiten

Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung überhaupt. Sie führt zur Einschränkung der Gelenkbeweglichkeit, Funktionsverlust des Gelenkes und zu chronischen immobilisierenden Schmerzen [47, 48]. Da die konservative Therapie mittels Krankengymnastik und die rein symptomatische analgetische Therapie das Fortschreiten einer Arthrose kaum aufhalten kann, führt die Behandlung einer fortgeschrittenen symptomatischen Arthrose bei älteren Patienten sehr häufig zu einem operativen Gelenkersatz. Das Ziel einer Arthroplastik, ist die Reduktion von Schmerzen und gleichzeitig weitgehender Erhalt der Beweglichkeit und der Stabilität des Gelenkes. Die am häufigsten betroffenen Gelenke sind Knie- und Hüftgelenke. Reine Hüftendoprothesen werden bei ca. 1 500 000 Patienten pro Jahr weltweit implantiert.

Die postoperativen Komplikationen stellen jedoch ein erhebliches Risiko für die Patienten dar [49, 50]. Die postoperative Zufriedenheit der Patienten ist unvollkommen. Es wird beschrieben, dass ca. 10% der Patienten mit dem Operationsergebnis unzufrieden sind [51]. Die Revisionsrate nach Hüftarthroplastik nach 10 Jahren liegt bei ca. 10% [52]. Die 12-jährige Haltbarkeit einer Hüftendoprothese liegt laut Literatur bei 60% - 81% [53]. Die mit dem Alter steigende Lockerungsrate stellt ein besonderes Risiko für junge Patienten dar [52, 53]. Häufig werden den Arthrosepatienten als minimalinvasive Therapie Injektionen mit Hyaluronsäure angeboten. Es ist ein gängiges Vorgehen im ambulanten Behandlungsbereich. Die Hyaluronsäure ist für die Bindung von Aggrecan zur großen Proteoglykanaggregaten verantwortlich (Abbildung 3). Die randomisierte, doppel-blinde Studie an 196 Patienten von van der Weegen et al. zeigt jedoch keinen Unterschied nach Hyaluronsäurebehandlung im Vergleich zur Placebo-Gruppe im 6 monatigen Verlauf [54]. Bei traumatischen Knorpeldefekten besteht die Möglichkeit einer autologen Chondrozytentransplantation (ACT). Es werden Chondrozyten aus unbelasteten Knorpelzonen entnommen, *in vitro* expandiert und in die Defektzonen implantiert. Für die größeren Knorpeldefekte kann eine Matrix assoziierte ACT nützlich sein. Die *in vitro* expandierten Chondrozyten werden auf einem Trägermaterial in die Defektzone implantiert. Diese Therapiemethode ist aber auch nur für isolierte Knorpeldefekte geeignet. Die Langzeitergebnisse sind ebenfalls nicht zufriedenstellend [55, 56]. Ein tieferes Verständnis der Pathogenese der Arthrose und daraus entwickelbare potenzielle frühzeitige Therapieansätze könnten für den orthopädischen Patienten zukünftig große Vorteile bringen. Die Ätiologie der Arthrose ist multifaktoriell. Aufgrund der eingeschränkten Regenerations- und Proliferationsfähigkeit der Chondrozyten führt eine übermäßige Gelenkbelastung zur langsamen Entstehung der Arthrose, auch Osteoarthrose genannt [44]. Der Begriff Osteoarthrose wird in der Literatur neben dem der Arthrose verwendet, weil die Knorpeldegeneration auch zur Umbauprozessen und Deformitäten des Gelenk-nahen Knochens führt [47, 48]. Die Knochendichte direkt unterhalb der Knorpelschicht wird höher. Man spricht von subchondraler Sklerosierung. Weiterhin wird die Gelenkoberfläche durch knöcherne Anbauten vergrößert. Es bilden sich sogenannte Osteophyten aus. Im Endstadium einer Arthrose kommt es zur Versteifung des Gelenks, einer Ankylose [57]. Abbildung 4 zeigt ein konventionelles radiologisches Bild des Beckens. Es zeigt sich eine fortgeschrittene Coxarthrose rechts.



Abbildung 4: Konventionelle radiologische Aufnahme des Beckens, auch Beckenübersichtsaufnahme genannt. Es zeigen sich die typischen Merkmale einer Arthrose der rechten Hüfte, nämlich die subchondrale Sklerosierung, Osteophyten und die Gelenkspaltverschmälerung (rote Kreise). Die Aufnahme stammt aus der Klinik für orthopädische, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie und aus der Klinik und Hochschulambulanz für Radiologie, Campus Benjamin Franklin, Charité-Universitätsmedizin, Berlin.

Nicht nur biomechanische sondern auch biochemische Reize führen zur Entstehung einer Arthrose. Die Prävalenz der Arthrose ist bei übergewichtigen Menschen höher als in der Durchschnittsbevölkerung [58]. Es wird vermutet, dass nicht nur die übermäßige körperrgewichtbedingte Belastung zur Gelenkschädigung führt, sondern auch humorale Komponenten eine Rolle spielen. Adiponektin ist ein Hormon, das in den Adipozyten

gebildet wird. Höhere Konzentrationen an Interleukin-6 (IL-6) und Adiponektin wurden in der Synovialflüssigkeit bei adipösen Patienten im Vergleich zu normalgewichtigen Probanden detektiert. Leider ist die Studienlage diesbezüglich noch spärlich und nicht schlüssig [59-61]. Es ist schon seit längerem bekannt, dass ein Gelenktrauma wie zum Beispiel eine intraartikuläre Fraktur zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren führt. Es kommt zur erhöhten Sekretion unter anderem von TNF α , IL-1 β und diversen Proteasen. Dieser Prozess führt zum Abbau von Kollagen und Proteoglykanen, aber auch zur Apoptose der Chondrozyten [45]. Die Degeneration des Knorpels wird hauptsächlich durch TNF α induziert. Erhöhte Konzentrationen an TNF α in der Synovialflüssigkeit werden auch bei primärer Arthrose detektiert. Dieses Zytokin hemmt die Synthese des ECM und induziert eine Kaskade von sekundären pro-inflammatorischen Zytokinen. Die Degeneration des Knorpels wird deutlich beschleunigt [62, 63]. Als Gegenspieler von TNF α wird in der Literatur das IL-10 beschrieben [64, 65].

3.7 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das eine entscheidende Rolle in unserem Immunsystem spielt. Dieses Zytokin wurde erst im Jahr 1989 von Fiorentino et al. in den T-Helferzellen entdeckt. Die Arbeitsgruppe glaubte, dass die Sekretion dieses Proteins nur in den T-Zellen stattfindet [65]. Heutzutage wird die Sekretion dieses Zytokins in verschiedenen Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, dendritischen Zellen oder Granulozyten nachgewiesen [23, 66]. In Tierversuchen mit IL-10 knockout Mäusen wurde gezeigt, dass die IL-10-Deletion zur Entwicklung einer chronischen Kolitis führen kann [67]. Die Blockierung von IL-10-Expression führte in den Tierversuchen zusätzlich zu multiplen Knochendeformitäten. Aus diesem Grund, wird vermutet, dass diese Knochenanomalien durch die übermäßige, osteoinduktive Aktivität von TNF α verursacht werden [68]. IL-10 blockiert die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF α , über die Aktivierung von STAT3 und gleichzeitig die Induktion des IL-10 Rezeptors [23]. Weitere Studien beweisen, dass dieses Zytokin ebenso in anderen Zelltypen exprimiert wird. IL-10 spielt auch eine wichtige Rolle in den Chondrozyten und soll eine chondroprotektive Wirkung aufweisen. IL-10 hat einen stimulierenden Effekt auf die Genexpression von Kollagen Typ II und Aggrekan in Chondrozyten [45, 69]. In *in vitro* Studien wurde eine erhöhte Expression von IL-10 in Chondrozyten nachgewiesen, die aus einem arthrotischen

Gelenk stammen. Im Vergleich dazu, war die Expression bei gesunden Spendern deutlich niedriger. Dieses Zytokin fördert die Differenzierung und die Proliferation der Chondrozyten [70]. Über die Aktivierung von STAT3 steigert IL-10 die Expression von BMP-2 (bone morphogenic protein) und BMP-6 [70, 71]. Es wird vermutet, dass die BMPs eine wichtige Rolle nicht nur im Knochen- sondern auch im Knorpelstoffwechsel haben. Die Rolle des IL-10 im Arthroseprozess bleibt jedoch noch unerforscht. Höhere Konzentrationen an IL-10 wurden in der Synovialflüssigkeit der arthrotisch veränderten Gelenke nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe von Helmark et al. zeigte eine signifikant höhere Gelenk-IL-10-Konzentration bei Patienten mit Gonarthrose, die regelmäßige krankengymnastische Übungen durchgeführt hatten [71]. Dank der Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und Induktion der IL-10 Sekretion in anderen Zellen besitzen mesenchymale Stammzellen eine immunmodulatorische Wirkung [72, 73]. Es wird beschrieben, dass MSCs durch die Überexpression von IL-10 in einem Tiermodell in der Lage sind eine Abstoßungsreaktion bei autologen Lebertransplantation zu verzögern [74]. Jedoch bleibt die Frage ob IL-10 einen Einfluss auf die chondrogene Differenzierung der MSCs hat unbeantwortet.

3.8 TNF α

Im Gegensatz zur IL-10 ist TNF α ein pro-inflammatorisches Protein und gehört zu den am längsten bekannten Zytokinen [75]. TNF α wurde vor mehreren Jahrzehnten im Serum von mit bakteriellen Endotoxin infizierten Mäusen detektiert. Schon damals wurde vermutet, dass dieses Zytokin an der Abwehrreaktion bei bakteriellen Infektionen durch Induktion der Apoptose beteiligt ist [76]. Weitere Studien belegten, dass dieses Zytokin von diversen Zellen des menschlichen Körpers sezerniert wird. Es führt zur Homöostase, Proliferation oder Apoptose der Zellen. TNF α induzierte darüber hinaus die Mobilisierung der Lymphozyten und ihre Migration zum Infektionsfokus [77]. Die Expression von TNF α wird durch NF- κ B gesteuert. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression diverser pro-inflammatorischer Zytokine reguliert [78]. Erhöhte Expression von TNF α wird bei verschiedenen inflammatorischen Prozessen detektiert. Die Makrophagen sezernieren bei einer bakteriellen Infektion erhöhte Mengen an TNF α . Eine gewisse Dysregulation, beziehungsweise Überexpression von TNF α kann unerwünschte Prozesse, die zu chronischen Erkrankungen in verschiedenen Geweben führen, verursachen [79, 80]. So kommt es zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis zu einem aseptischen Entzündungsprozess im Gelenk und letzten Endes zu einer

Gelenkdestruktion. Eine entscheidende Rolle scheint dabei die durch TNF α induzierte CD95-Überexpression in den Synovialfibroblasten zu spielen [81]. TNF α scheint auch einen osteoinduktiven Effekt auf die MSCs zu haben. Vermittelt durch NF- κ B kommt es zu erhöhter Expression von BMP-2 und letzten Endes zur osteogenen Differenzierung der MSCs [82]. Die genaue Wirkungsweise und weitere Interaktionen von TNF α bleiben zwar nach wie vor unbekannt, aber die TNF α -Inhibitoren werden heutzutage in der Medizin bei zum Beispiel rheumatoiden oder Psoriasis Arthritis erfolgreich angewendet [83, 84].

3.9 Fragestellung

Degenerative als auch traumatische Knorpeldefekte führen bei Millionen von Menschen weltweit zur Einschränkung der Mobilität und zur chronischen Schmerzen. Die Therapiemöglichkeiten sind aufgrund der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des Knorpels begrenzt und die Entwicklung einer risikoarmen und effektiven Methode zur rechtzeitigen Behandlung der Degeneration ist essentiell. Eine Zelltherapie oder eine Regulierung der Zytokinexpression im Gelenk könnte zukünftig eine wichtige Rolle in der Arthrosebehandlung spielen. MSCs als Vorläuferzellen der Chondrozyten haben ein großes Potenzial in der Entwicklung neuartiger Therapieansätze. Im Hinblick auf die chondrogene Differenzierung der MSCs ist die Literaturlage weiterhin nicht schlüssig und die biochemischen Prozesse bleiben unklar. Die Kenntnis der Wirkung von Zytokinen auf die MSCs könnte neue Ansatzpunkte in der regenerativen Medizin bieten. Dabei ist die Rolle von IL-10, eines typischen anti-inflammatorischen Zytokins, unklar. Das Ziel dieser Doktorarbeit war einerseits die Charakterisierung der chondrogenen Differenzierung der MSCs in einer trägerfreien dreidimensionalen Kultur. Weiterhin sollte der Einfluss von IL-10 in Wechselwirkung mit TNF α auf die chondrogene Differenzierung der MSCs beschrieben werden.

Nach der Bestimmung der exprimierten Oberflächenproteine werden die isolierten menschlichen MSCs aus dem Knochenmark auf ihre Multipotenz durch Differenzierung in osteogene, adipogene und chondrogene Richtung untersucht. Die MSCs wurden in der Monolayerkultur expandiert, so dass zum Schluss eine einheitliche Zellmasse hergestellt werden kann. Diese Zellkulturen werden chondrogen differenziert und mit IL-10, mit TNF α oder mit IL-10 und TNF α stimuliert. Mit Hilfe von (immun-)histologischen Färbungen und RT-PCR wird die Expression von typischen Markern des hyalinen Knorpels, nämlich Kollagen Typ II und Aggrekan untersucht.

Die Erkenntnisse meiner Arbeit könnten die bestehenden Therapiemöglichkeiten der Knorpeldegeneration erweitern und einen weiteren Einblick in die Rolle von IL-10 und TNF α und deren Wechselwirkung geben.

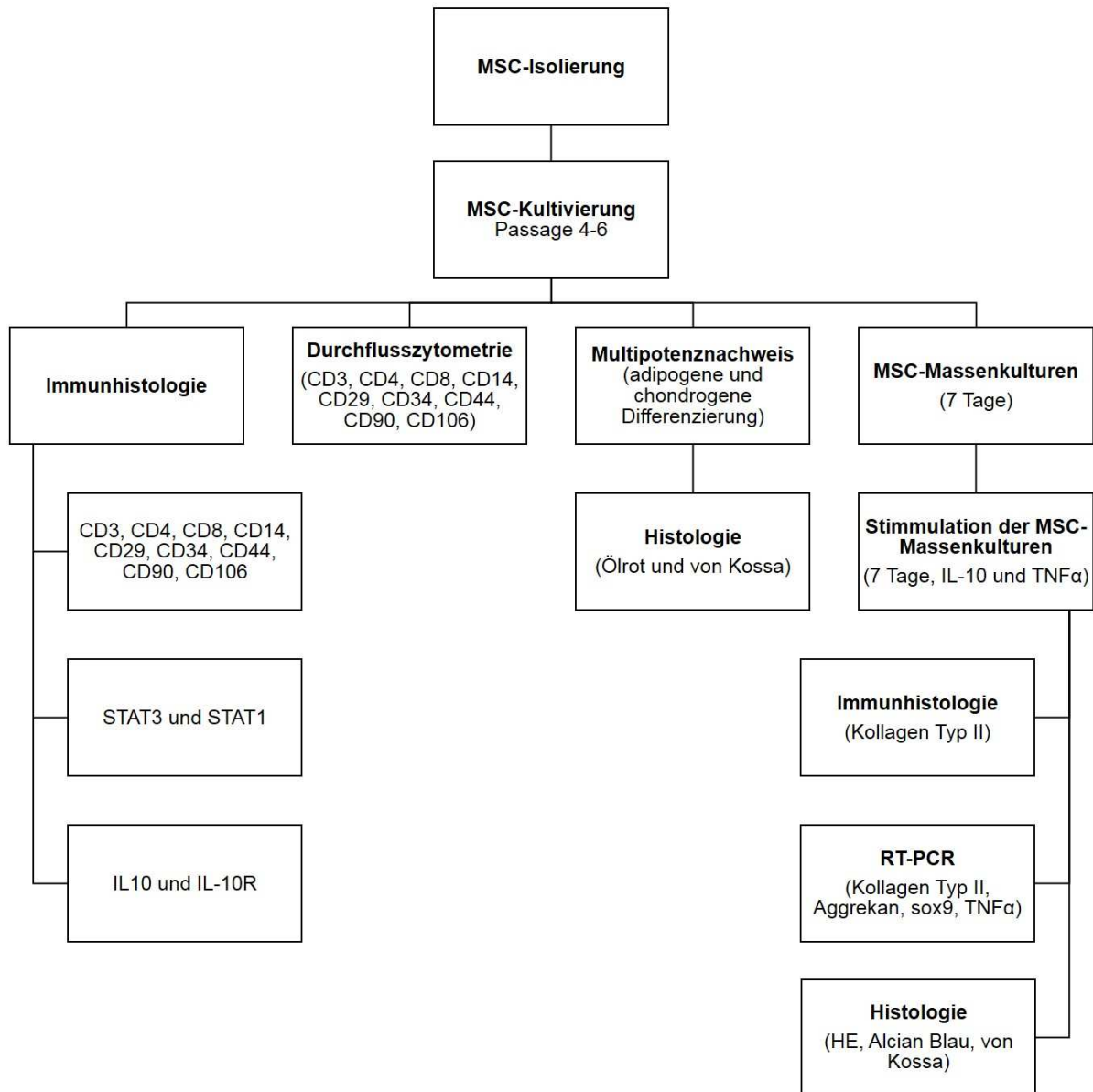


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Methodik dieser Doktorarbeit.

4. Material

4.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH, DE
Aceton	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Alcianblau 8GX, 1 %	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Alginat	Sigma-Aldrich, USA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, USA
Biocoll-Trennlösung	Biochrom AG, DE
Dexamethason	Sigma-Aldrich, USA
Dimehtylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Dulbecco´s modified Eagle´s Medium	Biochrom AG, DE
Eosin	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Eselserum	Chemicon, USA
Essigsäure	Merck KGaA, DE
Ethanol, 70/80/96/100 % (vergällt)	Merck KGaA, DE
Fluoromount	Southern Biotech, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, DE
Glucose	Biochrom AG, DE
Glycerol - 3- Phosphat	Sigma-Aldrich, USA
Hämatoxilin	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
HEPES	Biochrom AG, DE

Indomethacin	Sigma-Aldrich, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, USA
Isobutyl -1-methylxanthin	Sigma-Aldrich, USA
IST+1	Sigma-Aldrich, USA
Kernechtrot	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
L-Glutamin	Biochrom AG, DE
Linolsäure	Sigma-Aldrich, USA
MCDB	Sigma-Aldrich, USA
Natriumhydrogencarbonat	Biochrom AG, DE
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, USA
Oil Red O (Ölrot)	Sigma-Aldrich, USA
Paraformaldehyd, 4 %	USB Corporation, USA
Partricin	Biochrom AG, DE
PBS	Biochrom AG, DE
Penicillin	Biochrom AG, DE
Prolin	Sigma-Aldrich, USA
Rosiglitazon	Sigma-Aldrich, USA
Roticlear	Carl Roth GmbH, DE
Selen	Sigma-Aldrich, USA
Silbernitrat	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Streptomycin	Biochrom AG, DE
TGF- β 1	Peppo Tech, DE

Tissue-Tek O.C.T- Compound	Sakura Finetek Europe, NL
Transferrin	Sigma-Aldrich, USA
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Merck KGaA, DE
Triton X100	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Trypsin	Biochrom AG, DE
Xylol	JT Baker Laboratory Chemicals, USA

4.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cellscraper 24 cm	TPP, CH
Deckgläser	Menzel- Gläser, DE
Falcon- Röhrchen	Becton Dickinson Labware, USA
Filtervorsatz (140 µm)	Millipore Corporation, USA
Kryomolds	Sakura Finetek, USA
Kryoröhrchen	Nunc Incorporated, USA
Membranfilter aus Celluloseacetat	Sartorius, DE
Metallgitter	maßgefertigt
Multiwell- Platte (6 well)	Sarstedt Incorporated, USA
PCR- Platten	Biozym Scientific GmbH, DE
Petrischalen	Sarstedt Incorporated, USA
RNA Nano LabChip	Agilent Technologies, USA

Skalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd, JPN
Spritzen	BD Plastipak, IRL
SuperFrostplus®-Objektträger	R.Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, DE
Zellkulturflaschen	Sarstedt Incorporated, USA

4.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Bioanalyzer	Agilent Technologies, USA
Brutschrank HERA	Heraus Holding GmbH, DE
Canon EOS 500D	Canon Deutschland GmbH, DE
FACScalibur flow cytometer	BD Bioscience, USA
Invertmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, DE
Kamera Color View II	Olympus Europa Holding GmbH, DE
Kryostat HM 560 CryoStar	Thermo Scientific, USA
Mastercycler	Eppendorf AG, DE
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss AG, DE
Mikrotiterplattenphotometer GENios	Tecan Trading AG, CH
Multifuge 1s	Heraus Holding GmbH, DE
NanoDrop 1000 Spektralphotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, DE
Opticon I	Bio-Rad Laboratories, USA
Sterilbank HERA	Heraus Holding GmbH, DE

Thermo- Cycler	Bio-Rad Laboratories, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, DE
Wasserbad WBU 45	Memmert GmbH und Co. KG, DE
Zentrifuge 5415D	Eppendorf AG, DE

4.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Primär Antikörper	Sekundär Antikörper
CD3, Maus anti-human (Maus IgG2a), r-Phycoerythrin gekoppelt Invitrogen, USA	entfällt
CD4, Maus anti-human (Maus IgG2a), Fluorescein (FITC) gekoppelt Invitrogen, USA	entfällt
CD8, Maus anti-human (Maus IgG2a), Fluorescein (FITC) gekoppelt Invitrogen, USA	entfällt
CD14, Maus anti-human (Maus IgG 2a), Fluorescein (FITC) gekoppelt Invitrogen, USA	entfällt
CD29, Maus anti-human (Maus IgG1), Millipore, USA	Esel F(ab)2 Fragment-anti-Maus-APC, Dianova, DE
CD34, Maus anti-human (Maus IgG1, k), Allophycocyanin (APC) gekoppelt BD Pharmingen, USA	entfällt
CD44, Maus anti-human (Maus IgG 2a), Cell signaling, USA	Esel F(ab)2 Fragment-anti-Maus-APC, Dianova, DE
CD90, Maus anti-human (Maus IgG1, k), Fluorescein (FITC) gekoppelt BD Pharmingen, USA	entfällt
CD106, Maus anti-human (Maus IgG1), Millipore, USA	Esel F(ab)2 Fragment-anti-Maus-APC, Dianova, DE

4.5 Antikörper für die Immunhistologie

Primär Antikörper	Sekundär Antikörper
IL-10, Kaninchen-anti-human tebu bio GmbH, DE	Esel-anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488 Invitrogen, USA
Kollagen Typ II, Kaninchen-anti-human Acris Antibodies GmbH, DE	Esel-anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488 Invitrogen, USA
IL-10-Receptor- α , Maus-anti-human Millipore, USA	Esel-anti-Maus-Alexa Fluor 488 Invitrogen, USA
STAT1, Kaninchen-anti-human Cell Signaling, USA	Esel-anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488 Invitrogen, USA
STAT3, Kaninchen-anti-human Cell Signaling, USA	Esel-anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488 Invitrogen, USA

Die Zellkernfärbung erfolgte mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) von Roche Diagnostics GmbH, DE.

4.6 Primer

Gen (Symbol)	NCBI Genreferenz	Amplifikat	Hersteller
β-Aktin (ACTB)	NM_001101.2	171 bp	ABI*
Aggrekan (ACAN)	NM_013227.2	93 bp	ABI*
sox9 (SOX9)	NM_000346.2	102 bp	ABI*
TNFα (TNF)	NM_000594.2	80 bp	ABI*
β-Aktin (ACTB)	NM_001101.2	146 bp	Qiagen, NL
Kollagen Typ II (COL2A1)	NM_001844, NM_033150	142 bp	Qiagen, NL

* ABI, Applied Biosystems® (life technologies™), USA

4.7 Kits

Methode	Kit, Hersteller
RNA-Isolation	MasterPure™ Plant RNA Purification, Epicentre Biotechnologies, USA und RNeasy- Kit, Qiagen, DE
RNA-Konzentrationsmessung	RNA Nano LabChip, Agilent Tech., USA und NanoDrop 1000, Thermo Scientific, DE
cDNA-Synthese	QuantiTec Reverse Transcription, DE
PCR	TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems®, USA und Quantitec Gene Expression Assay, Qiagen, NL

4.8 Medien

MSC Wachstumsmedium		Chondrogenes Differenzierungsmedium	
Ascorbinsäure	1 µg/ml	L-Glutamin	10 µl/ml
Dexamethason	1 µg/ml	HEPES	25 µl/ml
DMEM	51ml/100ml	Na-Pyruvat	10 µl/ml
Fötale Kälberserum (FCS)	15ml/100ml	Dexamethason	0.1 µl/ml
Insulin	5 µg/ml	Ascorbinsäure	1.7 µl/ml
Linolsäure	4.7 µg/ml	Prolin	1 µl/ml
MCDB mit L-Glutamin	34ml/100ml	ITS+1	10 µl/ml
Penicillin	50 IU/ml	Streptomycin	50 IU/ml
Selen	5 ng/ml	Penicillin	50 IU/ml
Streptomycin	50 IU/ml	TGF-β	10 ng/ml
Transferrin	5 µg/ml	DMEM	10ml

Osteogenes Differenzierungsmedium		Adipogenes Differenzierungsmedium	
--	--	--	--

Dexamethason	1 µl/ml	Indomethacin	2 µl/ml
Glycerol - 3- Phosphat	10 µl/ml	Isobutyl-1-	1 µl/ml
Ascorbinsäure	2 µl/ml	Methylxanthine	
HEPES	25 µl/ml	Rosiglitazone	1 µl/ml
Streptomycin	50 IU/ml	Insulin	4 µl/ml
Penicillin	50 IU/ml	Dexamethason	1 µl/ml
FCS	0,1 ml/ml	FCS	0,1 ml/ml
DMEM	10ml	Streptomycin	50 IU/ml
		Penicillin	50 IU/ml
		HEPES	25 µl/ml
		DMEM	10ml

5. Methoden

5.1 MSC – Isolierung

Die Isolierung der Stammzellen erfolgte aus der Spongiosa menschlicher Femurköpfe unter Beachtung der ethischen Grundsätze (Ethikantrag EA4-024-09). In die Studie wurden 10 Patienten im Alter von 35 bis 88 Jahren eingeschlossen, die im Rahmen einer Coxarthrose oder traumatischer Femurhalsfraktur einen endoprothetischen Hüftgelekkersatz bekamen. Das mittlere Alter betrug 67,8 Jahre und 70% der Patienten waren weiblich. Patienten mit pathologischen Frakturen, oder Femurkopfnekrosen wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Intraoperativ legte das OP-Personal die Femurköpfe in einen sterilen mit PBS gefüllten Transport-Behälter ein. Die Explantate wurden bis zum Transport in das Labor bei +4°C aufbewahrt. Die mittlere Lagerungszeit betrug weniger als 24h. Direkt nach dem Transport erfolgte die Isolierung der Stammzellen aus der Spongiosa des jeweiligen Femurkopfes mittels Dichtegradientenzentrifugation unter sterilen Bedingungen.

5.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

Die MSCs können mit Hilfe von einem hydrophilen Polymer, Polysucrose, der in der isotonischen Biocoll – Trennlösung erhalten ist, von Gewebsresten separiert werden.

Aus dem Hüftkopf-Explantat wurde der spongiöse Knochen mit Pinzetten und Knochenzange vorsichtig abpräpariert und im eiskalten PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Mischung durch ein Teesieb gefiltert. Die abgetrennte Flüssigkeit wurde mit einer 20 ml Spritze durch einen Filtervorsatz von 140 µm in ein steriles 50 ml – Röhrchen gepresst. Der Filter wurde zusätzlich mit eiskaltem PBS auf 50 ml Gesamtvolumen nachgespült. Das Filtrat wurde für 7 min bei 4°C und 1000 U/min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend mit 50 ml kaltem PBS gewaschen. Um eine höhere Anzahl an Zellen zu gewinnen, wurde das übrige Material aus dem Teesieb mit 0,075% Kollagenase Typ I in DMEM-Lösung bei 37°C für 30 min unter dauerhaften Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 5% FCS angehalten. Die so entstandene Suspension wurde über ein weiteres Teesieb in ein steriles Becherglas gefiltert und die Flüssigkeit ebenfalls mit 20mL – Spritze durch einen Filtervorsatz von 140 µm in ein steriles 50 ml – Röhrchen gepresst. Der Filter wurde zusätzlich mit eiskaltem PBS auf 50 ml Gesamtvolumen nachgespült. Das Filtrat wurde für 7 min bei

4°C und 1000 U/min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend mit 50 ml kaltem PBS gewaschen. Die so entstandenen Pellets wurden resuspendiert und über ein weiteres Teesieb in ein steriles Glas durchsiebt. Das neue Material wurde wie bereits oben beschrieben erneut durch einen Filtervorsatz von 140 µm in ein steriles 50 ml – Röhrchen filtriert und für 7 min bei 4°C und 1000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml eiskaltem PBS gelöst und vorsichtig auf 10 ml Biocoll – Trennlösung in einem 15 ml – Röhrchen aufgetragen und für 20 min unter 1100 U/min bei 4°C zentrifugiert.

Die MSCs sammeln sich in der Interphase des Biocoll – Gradienten und können somit mit einer Pipette relativ einfach isoliert werden. Die isolierten Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in MSC – Wachstumsmedium resuspendiert, in eine T-75 Zellkultur – Flasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 2 bis 3 Tagen wurden die Zellen mit Hilfe von 1x – Trypsin vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Das Medium mit den suspendierten Zellen wurde abpipettiert und die Kulturflaschen mit PBS nachgespült. Im Medium und PBS suspendierte Zellen wurden zusammen in ein Falcon – Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde erneut in PBS resuspendiert und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Vor dem letzten Waschschrift erfolgte die MSC – Zählung in der Neubauer-Zählkammer. Das gewaschene Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO, resuspendiert und bei - 80°C in einem Kryoröhrchen über die Nacht gelagert. Anschließend wurden die Proben im Flüssigstickstoffbehälter gelagert.

5.2 MSC – Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 90% - Luftfeuchtigkeit und 5%-CO₂. Zuerst wurden die Zellen im Kryoröhrchen in der Hand aufgetaut und in 10 ml MSC – Wachstumsmedium aufgelöst. Die Lösung wurde bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 20 ml MSC – Wachstumsmedium resuspendiert. Es wurden 1 x 10⁶ Zellen pro T175 Falcon – Kulturflasche verteilt und das Gesamtvolumen pro Kulturflasche auf 22 ml Wachstumsmedium nachgefüllt.

Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Bei den Passagieren der Zellen wurden die Kulturflaschen mit PBS gewaschen, so dass nur die adhären MSCs übrig blieben. Danach wurden die Flaschen mit 3 ml 1x – Trypsin gefüllt und für 4 min inkubiert. Um die MSC von der Oberfläche zu lösen, wurden die Flaschen vorsichtig

abwechselnd geschwenkt und leicht gegen die Flaschen-Seite geklopft. Die Trypsinwirkung wurde anschließend mit 10% FCS enthaltendem Medium gestoppt. Die MSC-Suspension wurde bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert und das entstandene Pellet anschließend in PBS resuspendiert und erneut bei 1000 U /min für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden wie bereits oben beschrieben auf die Kulturflaschen verteilt. Der Vorgang wurde spätestens nach der 6. Passage unterbrochen.

5.3 Durchflusszytometrie

Direkt nach der Kultivierung wurden pro Spender ca. 3×10^6 Zellen in 2% - Paraformaldehyd-Lösung für 10 min fixiert und anschließend mit PBS gespült. Die Lösung wurde für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und das Pellet erneut in PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in FACS – Puffer resuspendiert. Es wurden $3 - 5 \times 10^5$ Zellen pro 1,5 ml – Reaktionsgefäß verteilt und mit 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Parallel wurden die Primärantikörper 1:20 im FACS – Puffer verdünnt. Die Pellets wurden in den entsprechenden 50 µl Antikörperlösung resuspendiert und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf 500 µl mit FACS – Puffer nachgespült und bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Gleichzeitig wurden die Sekundärantikörper 1:200 im FACS – Puffer ebenfalls verdünnt. Die Pellets wurden danach in 50 µl Sekundärantikörperlösung aufgelöst und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben doppelt gewaschen. Die direkt Fluorophor-gekoppelten Antikörper wurden ebenso 1:200 im FACS – Puffer verdünnt und erst beim zweiten Färbeabschnitt angewendet. Die verwendeten Antikörper sind unter Punkt 3.4 aufgelistet.

Die Proben wurden unmittelbar nach der Färbung mittels FACS calibur flow cytometer untersucht und die Ergebnisse mit FlowJo 7.0 (Tree Star Inc., USA) ausgewertet.

5.4 Multipotenz

Ferner wurde die Multipotenz der isolierten Zellen nach abgeschlossener Kultivierung untersucht. Die MSCs wurden auf mit Poly L Lysin-beschichteten Glass-Plättchen in 6 – Well – Platten in adipogenen und osteogenen Differenzierungsmedium kultiviert. Die chondrogene Differenzierung wurde in Massenkulturen durchgeführt (siehe Punkt 4.5) In jedem Well wurden 4 Plättchen platziert. Pro Plättchen wurden ca. 2×10^4 Zellen aus einem Pellet mithilfe einer 20 µl Pipette aufgetragen. Jedes Well wurde mit 3 ml der

jeweiligen Induktionsmedium versorgt. Ein Mediumwechsel erfolgte immer am Montag, Mittwoch und Freitag. Bei der adipogenen Differenzierung wurden die Zellen über jedes Wochenende mit MSCs – Wachstumsmedium versorgt. Die Differenzierung dauerte 28 Tage. Die Plättchen wurden jeweils nach 14, 21 und 28 Tagen untersucht.

5.4.1 Adipogene Differenzierung

Ölrot ist als fettlöslicher Farbstoff zum Nachweis von Lipiden und Triglyceriden in den fixierten Zellen geeignet [85]. Fixierung der MSCs erfolgte mit 4%- Paraformaldehyd-Lösung. Die Stammlösung wurde aus 0,5 g Ölrot Pulver und 100 ml Isopropanolol hergestellt. Die Gebrauchslösung wurde aus der Stammlösung und destillierten Wasser im Verhältnis 3:2 angefertigt.

Die Glasplättchen wurden in der Gebrauchslösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit PBS dreifach gewaschen. Es wurden jeweils 2 Glasplättchen auf einem Objektträger mit Rotimount eingedeckt.

5.4.2 Osteogene Differenzierung

Zum Nachweis der Calcium-Salze in den Zellen und damit der osteogenen Differenzierung wurde die von Kossa – Färbung angewendet. Die Glasplättchen wurden mit Methanol für 5 min fixiert und dreifach mit destillierten Wasser gewaschen. Nach Übertragung in die Petrischalen wurden die Glasplättchen für 30 min im Dunkeln in 2,5% - Silbernitrat – Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mit destilliertem Wasser gespült und für 7 min in der 5% - Natriumcarbonat – Lösung eingebettet. Um die Zellkerne darzustellen erfolgte anschließend für 10 min die Kernechtrotfärbung gefolgt von Entwässerungsschritten in einer aufsteigenden Ethanol – Reihe, jeweils 2 min in 70%, 80%, 96% und 100%. Die Glasplättchen wurden in Roticlear für 5 min gereinigt und auf Objektträgern mit Rotimount fixiert.

5.5 MSC – Massenkulturen

Es wurden sogenannte 3D – Massenkulturen hergestellt. In der 6 – Well – Platte wurde in jedem Well eine Edelstahlbrücke mit einem Membranfilter aus Celluloseacetat und einer Porengröße von 0,2 µm platziert. Initial wurden die Zellen zweifach für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und dabei der Überstand beseitigt. Zwischen 1 und 2 x 10⁶ MSCs wurden in Form eines 10 µl großen Tropfens mit einer 20 µl Pipette auf jedem Filter aufgetragen. Jedes Well wurde mit 2 ml Medium versorgt, so dass kein Kontakt zwischen dem Filter und der Flüssigkeit bestand. Die Diffusion des Mediums erfolgte

entlang der Gitter durch den Filter. 2 Wells erhielten das MSC – Wachstumsmedium und 4 Wells das chondrogene Differenzierungsmedium. Das Medium wurde jeweils am Montag, Mittwoch und Freitag gewechselt. Nach 7 Tagen wurde jeweils eine undifferenzierte und differenzierte Kultur mit IL-10, eine differenzierte Kultur mit TNF α und eine differenzierte Kultur mit IL-10 und TNF α für 7 Tage stimuliert. Die Konzentration der Zytokine betrug 10 ng/ml. Am 14. Tag wurde jede Kultur mit einem Invertmikroskop Axiovert 25 fotografiert und anschließend mit einem Skalpell halbiert. Alle Proben wurden nach jeweiliger histologischer Färbung in Roticlear für 5 min gereinigt und mit Rotimount fixiert.

5.6 Histologische Färbungen

Für die histologische Untersuchung wurde die Hälfte jeder Massenkultur in einem mit Tissue – Tek luftblasenfrei gefüllten Einbettschälchen (Cryomold) mit der Pinzette platziert und direkt danach in einem mit flüssigen Stickstoff gefüllten Behälter für 60 min gelagert. Nach dem Einfrieren wurden die Proben bei -80°C gelagert. Für die histologischen Färbungen wurden Gefrierschnitte in 7 μ m Dicke angefertigt.

5.6.1 Hämatoxylin und Eosin

Für die Übersichtsdarstellung wurde die Hämatoxylin und Eosin- (HE-) Färbung angefertigt. Die Kryoschnitte wurden für 4 min in Hämatoxylin- Lösung (nach Harris) eingelegt und anschließend einfach gespült. Die Hämatoxylin-Lösung führt zu einer bläulichen Färbung der Zellkerne. Um die restlichen Bestandteile der Zellen in verschiedenen Rottönen darzustellen wurden die Proben in Eosin – Lösung für 4 min inkubiert.

5.6.2 Alcianblau

Die Proteoglykane als wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix des Knorpels können mit der Alcianblau- (AB-) Färbung in blau dargestellt werden. Die Gewebeschnitte wurden für 2 min in 1% - Essigsäure inkubiert und anschließend für 15 min mit 1% - Alcianblaulösung gefärbt. Die rötliche Färbung der Zellkerne wurde durch eine Inkubation der Proben für 5 min in Kernechtrot – Lösung erzeugt. Die Schnitte wurden mit der aufsteigenden Ethanol – Reihe entwässert, wobei sie jeweils 2 min in 70%, 80%, 96% und 100%iger Ethanollösung eingetaucht wurden.

5.6.3 Von Kossa

Die indirekte Darstellung der Kalziumablagerung in den Massenkulturen wurde mit der von Kossa-(vK-)Färbung durchgeführt. Die Färbung erfolgte nach dem bereits unter Punkt 4.4.2 beschriebenen Protokoll.

5.6.4 Immunhistologie

Die Expression von IL-10, IL-10-Rezeptor (IL-10R), STAT1 und STAT3 als auch von Oberflächenmarkern wie CD3, CD4, CD8, CD14, CD 29, CD34, CD44, CD90, CD106 wurde an den undifferenzierten MSCs in einer 2D – Kultur untersucht. Dafür wurden die isolierten MSCs für 48 Stunden im MSC-Wachstumsmedium kultiviert. Als Kontrolle dienten in unserer Arbeitsgruppe isolierte Endothelzellen. Die Kryoschnitte wurden für die Expression von Kollagen Typ II untersucht.

Sowohl die undifferenzierten 2D – Kulturen als auch die 3D – Kulturen wurden für 15 min in 4% - Paraformaldehyd-Lösung fixiert und danach reichlich mit TBS gespült. Die Blockierung mit 5% - Eselsserum (mit 1xTBS verdünnt) dauerte 20 min. Für die sox9 – Färbung wurden die Zellen zusätzlich mit 0,1% - Triton X100 in Blockierungsmedium permeabilisiert. Die Primärantikörper (siehe Punkt 3.5) wurden im Verhältnis 1:20 mit Blockierungslösung verdünnt. Die Inkubation erfolgte in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur und dauerte 60 min. Unmittelbar danach wurden die Proben mit TBS dreifach gespült. Die weitere Arbeit erfolgte unter UV-freien Bedingungen. Die Sekundärantikörper wurden im Verhältnis 1:200 und der Zellkernfarbstoff DAPI im Verhältnis 1:25 in Blockierungsmedium verdünnt. Die Inkubation der Massenkulturen mit dem Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur und dauerte 60 min. Die Negativ-Kontroll-Färbung erfolgte mittels eines unspezifisch bindenden IgG1-Antikörpers, oder nur mit dem Sekundärantikörper. Zum Schluss wurden die Objektträger mit 1xTBS dreifach gespült und mit Fluoromount eingedeckelt. Die mikroskopische Auswertung der Immunmarkierung erfolgte an demselben Tag.

5.7 Genexpressionsanalysen

Um die mögliche Verunreinigungen und RNA – Degeneration zu vermeiden wurden für alle Genexpressionsanalysen RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet sowie alle Arbeitsflächen von RNAsen befreit.

5.7.1 RNA – Isolierung

Die RNA – Isolierung aus den Massenkulturen erfolgte initial mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen. Leider konnten von insgesamt 8 Proben nur äußerst geringe Mengen an RNA mit unzureichender Qualität gewonnen werden. Um die RNA – Gewinnung zu optimieren wurden mit den Zellen eines Spenders undifferenzierte Massenkulturen angefertigt, bei denen die RNA – Isolierung mittels RNeasy Mini Kit und MasterPure™ Plant RNA Purification – Kit im direkten Vergleich durchgeführt wurde. Bei erneut unbefriedigenden Ergebnissen mit dem Qiagen – Kit und ausreichenden Mengen an RNA mit guter Qualität bei Anwendung des MasterPure – Kit erfolgte die RNA – Isolierung für die in dieser Arbeit gezeigten Genexpressionsanalysen ausschließlich mit dem MasterPure™ Plant RNA Purification – Kit. Die Hälfte jeder 3D – Kultur wurde zuerst mehrfach mit PBS gereinigt und anschließend in das Reaktionsgefäß überführt, wo sie initial in Lysepuffer mit DTT und Proteinase K durch mehrfaches Aufziehen der Probe und Mischen in der Lösung homogenisiert wurde. Danach erfolgte eine Inkubation bei 56°C für 15 min. Um die Zellreste zu pelletieren wurden die Proben bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, mit jeweils 500 µL Isopropanolol gemischt und anschließend bei 4°C und 10000 x g für 10 min zentrifugiert. Um die möglichen DNA – Reste zu beseitigen wurden die so pelletierten Nukleinsäuren jeweils mit 200 µL DNase I – Lösung resuspendiert und bei 37°C für 10 min inkubiert. Danach wurden die Proben mit jeweils 200 µL 2xT -/ C Lyse – Lösung und MCP – Lösung gemischt und für 5 min auf Eis platziert. Die Zellreste wurden mit Zentrifugieren bei 4°C und 10000 x g für 10 min pelletiert. Die RNA wurde erneut mit 500 µL Isopropanolol und 70% - Ethanol gereinigt und pelletiert. Die so gewonnene RNA wurde pro Massenkultur mit 23 µL RNase – freiem Wasser resuspendiert. Ferner erhielt jede Probe 1 µL RiboGuard – Rnase – Inhibitor. Die Proben wurden bei – 80°C gelagert.

5.7.2 RNA – Konzentrationsmessung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer der Firma Thermo Scientific gemessen und mit dem dazugehörigen Programm automatisch berechnet. Bei einigen, zufällig ausgewählten Proben wurde die Konzentration und Qualität der RNA mit dem RNA Nano LabChip und dem Bioanalyzer

von der Firma Agilent Technologies bestimmt. Ein Chip besteht aus einer Gel-Matrix, mehreren Mikrotunneln und einem Fluoreszenzfarbstoff. Die Nucleinsäuren werden elektrophoretisch getrennt und mit dem Bioanalyzer – Programm graphisch dargestellt. Die Qualität der RNA wurde bei der NanoDrop – Bestimmung anhand des Quotienten aus der Absorptionsmessung bei 260 nm zu 280 nm Wellenlänge ermittelt. Bei der Agilent Nano LabChip Messung wurde die Qualität der isolierten RNA, beziehungsweise der Maß der RNA – Degradierung als RNA Integritätsnummer (RIN) ausgewertet [86].

5.7.3 cDNA – Synthese

Die cDNA – Synthese erfolgte mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit. Zuerst wurden die Proben von genomischer DNA mit Hilfe von DNA – Wipeout – Puffer gereinigt. Die reverse Transkription erfolgte mit dem QuantiTect Mastermix. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

5.7.4 Echtzeit – Polymerase – Kettenreaktion (RT PCR)

Die RT PCR ermöglicht mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Primern die Bestimmung der ausgewählten Gensequenzen. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zur PCR – Produkt ist, können die spezifischen Sequenzen quantifiziert werden. Die RT PCR beginnt mit der Denaturierung bei 95°C. Dabei wird der DNA-Doppelstrang getrennt. Nach diesem Schritt erfolgt bei 55°C das Ankoppeln des Primers an die analoge Sequenz der entstandenen Einzelstränge, das so genannte Annealing. Anschließend kommt es bei 72°C zu der Elongation, bei der aus den freien Nucleotiden ein komplementärer Zweitstrang entsteht. In dieser Arbeit wurden Primer von der Firma Qiagen und ABI angewendet. Die Primer von ABI bestehen aus einem Fluorophor an den 5' – Ende und einem Quencher am 3' – Ende und arbeiten nach dem sogenannten TaqMan Prinzip. Auf Grund der räumlichen Nähe der beiden Stoffe zueinander kommt es zu einer Unterdrückung der Fluoreszenz. Bei der Amplifikation der DNA in der Elongationsphase baut die DNA-Polymerase den Primer mit ihrer 5'→3'-Exonuklease-Aktivität ab und somit wird die räumliche Nähe der beiden Fluoreszenzstoffe aufgehoben und das Unterdrückungseffekt beendet. Mit der zunehmenden Kopiezahl steigt auch die Fluoreszenz. Bei den Primern von Qiagen gilt das QuantiTect Probe Prinzip. Bereits bei der Bindung des Primers an die komplementäre DNA wird die

räumliche Nähe zwischen den fluoreszierenden Stoffen aufgehoben und somit der Unterdrückungseffekt beendet.

Für die Untersuchungen wurden 96 – Well – Platten benutzt. In jedem Well befanden sich 10 µL Mastermix, 8 µL RNase-freies Wasser, 1 µL des genspezifischen Primers sowie 1 µL cDNA-Template. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung und für jeden Primer wurde eine Probe ohne cDNA als „non template control“ mitgeführt. Die Proben wurden auf ein Referenzgen, β -Aktin, normiert. Die Auswertung erfolgte mittels der C(t)-Werte, wobei ein C(t) – Wert dem PCR – Zyklus entsprach, bei welchem die Fluoreszenz den Schwellenwert überschreitet.

Die relative Probenquantifizierung erfolgte anhand der Pfaffl – Gleichung (Pfaffl 2001). Dabei wird die Expression des untersuchten Gens im Verhältnis zur Expression bei der unbehandelten Probe ausgedrückt. Dafür werden die Effizienzen der Zielgen - und Referenzgen – Primer miteinbezogen.

5.7.5 Effizienzbestimmung

Die Effizienz bezeichnet die Fähigkeit eines Primers in einem PCR – Zyklus die cDNA – Sequenz zu verdoppeln. Diese Fähigkeit kann aber aufgrund des Gewebetyps und der technischen Voraussetzung variieren. Es wurden die Effizienzen der Primeren bei Amplifizieren des MSC – cDNA untersucht. Dabei wurde die untersuchte cDNA in 4 Stufen verdünnt und anschließend mit jedem Primerem amplifiziert. Der C(t) – Wert ist vom Logarithmus der cDNA – Menge linear abhängig. Die erhaltene C(t) – Werte wurden graphisch dargestellt und aus der Gleichung $E=10^{-(1/\text{Anstieg})}$ konnte die Effizienz bestimmt werden.

5.8 Statistik

Für die Auswertung der Daten wurde das Program GraphPad Prism 5 (GraphPad software inc, San Diego, USA) angewendet. Für die Analysen wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet. Als signifikant galt $p \leq 0.05$.

5.9 Richtlinien

Die Arbeit basiert auf den Grundsätzen der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis.

6. Ergebnisse

Ziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung des Einflusses von IL-10 und TNF α auf die Chondrogenese der humanen MSCs. Um die klinische Relevanz zu erhöhen wurde dafür ein 3D – Kulturmodell angewendet. Die Identität der isolierten Zellen wurde mit dem Nachweis deren Oberflächenmarker und Differenzierungspotenzial bestimmt. Die Morphologie der Massenkulturen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen wurde anhand histologischer Färbungen dargestellt. Die Wirkung der Zytokine auf die Chondrogenese wurde auf der Genexpressionsebene und auf der Proteinebene weiter untersucht.

6.1 MSC – Charakterisierung

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der MSCs wurden das CD29 (β 1-integrin), CD44 (Hyaluronsäurerezeptor) und CD90 (Thymozyten Differenzierungsantigen 1) als sogenannte Positivmarker angewendet. Die CD3, CD4, CD8, CD14 und CD34 dienten als negative Oberflächenmarker. Für jeden Oberflächenmarker wurde bei der Analyse ein sogenanntes Gate (=Tor) erstellt. Dabei wurde die unspezifische Fluoreszenz mit Hilfe von unbehandelten Proben ausgeblendet und die minimale mögliche Fluoreszenz anhand von der entsprechenden Isotypkontrolle errechnet. Die CD106 (VCAM1) Expression wurde ebenfalls untersucht. Es gab große Unterschiede in der Expression von CD106 zwischen den Spendern, wobei der Mittelwert bei 44,13% (\pm 28,8) und die Extrema bei 86,76% und 5,86% lagen. Der prozentuelle Anteil der fluoreszierenden Zellen wurde in der Abbildung 6 graphisch dargestellt.

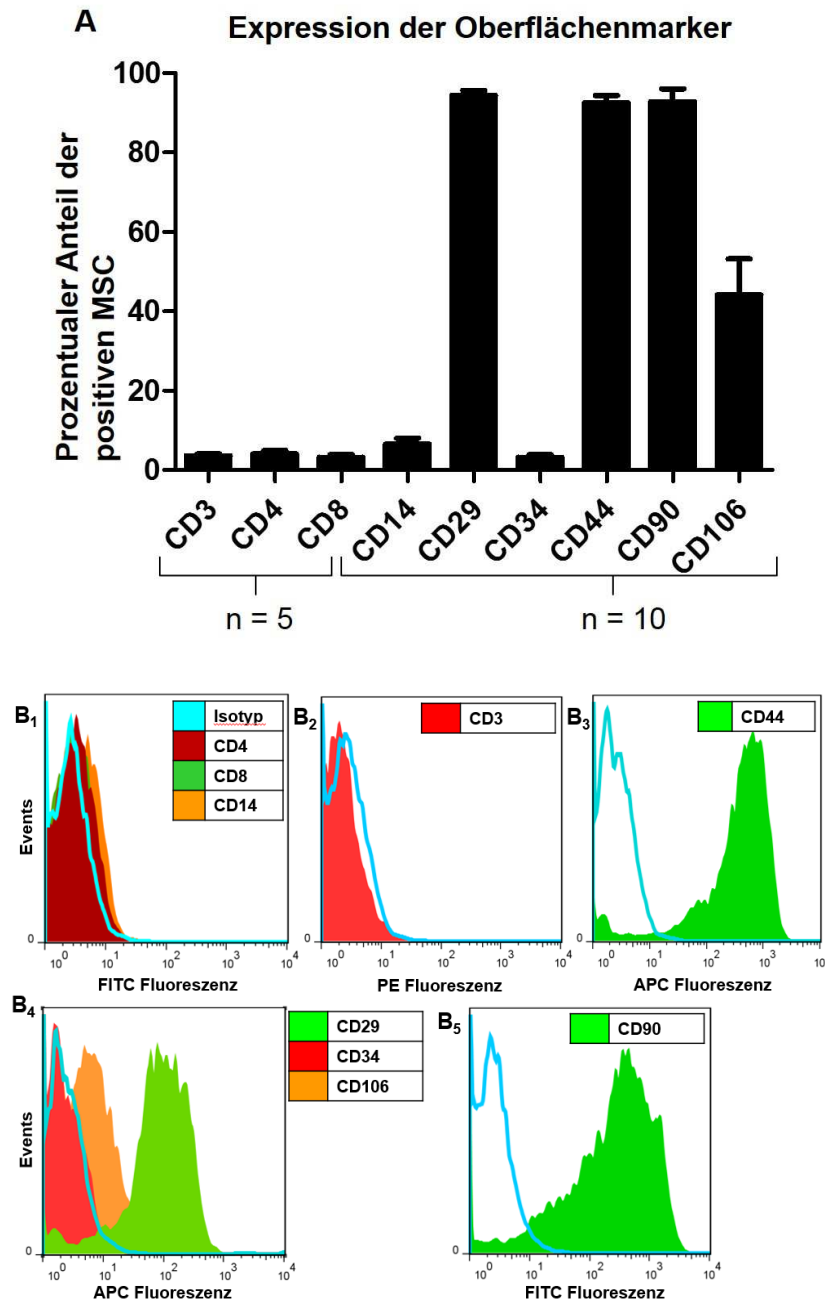


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse der MSCs. Die isolierten Zellen wurden auf die positiven (CD29, CD44, CD90) und negativen (CD3, CD4, CD8, CD14, CD34) MSCs Oberflächenmarker getestet. Dargestellt ist ein prozentualer Anteil der positiven Zellen (A); Weniger als die Hälfte der MSCs war CD106 positiv (n = 10). Die Mehrheit der adhärennten Zellen war CD34 negativ (n = 10). Die MSCs waren auch für Leukozytenmarker (CD3, CD4 und CD8) negativ. Die Histogramme von einem exemplarischen Spender sind ebenfalls dargestellt (B1–B5). FITC:Fluoresceinisothiocyatl; PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse stimmen mit den immunhistologischen Färbungen überein. Als Kontrolle wurden Endothelzellen verwendet. Die Endothelzellen stammten freundlicherweise aus der AG Prof. Jankowski. Die MSCs zeigten eine Expression von CD29, CD44 und CD90. Die Expression von CD34 war im Vergleich zur Endothelzellen schwach (Abbildung 7).

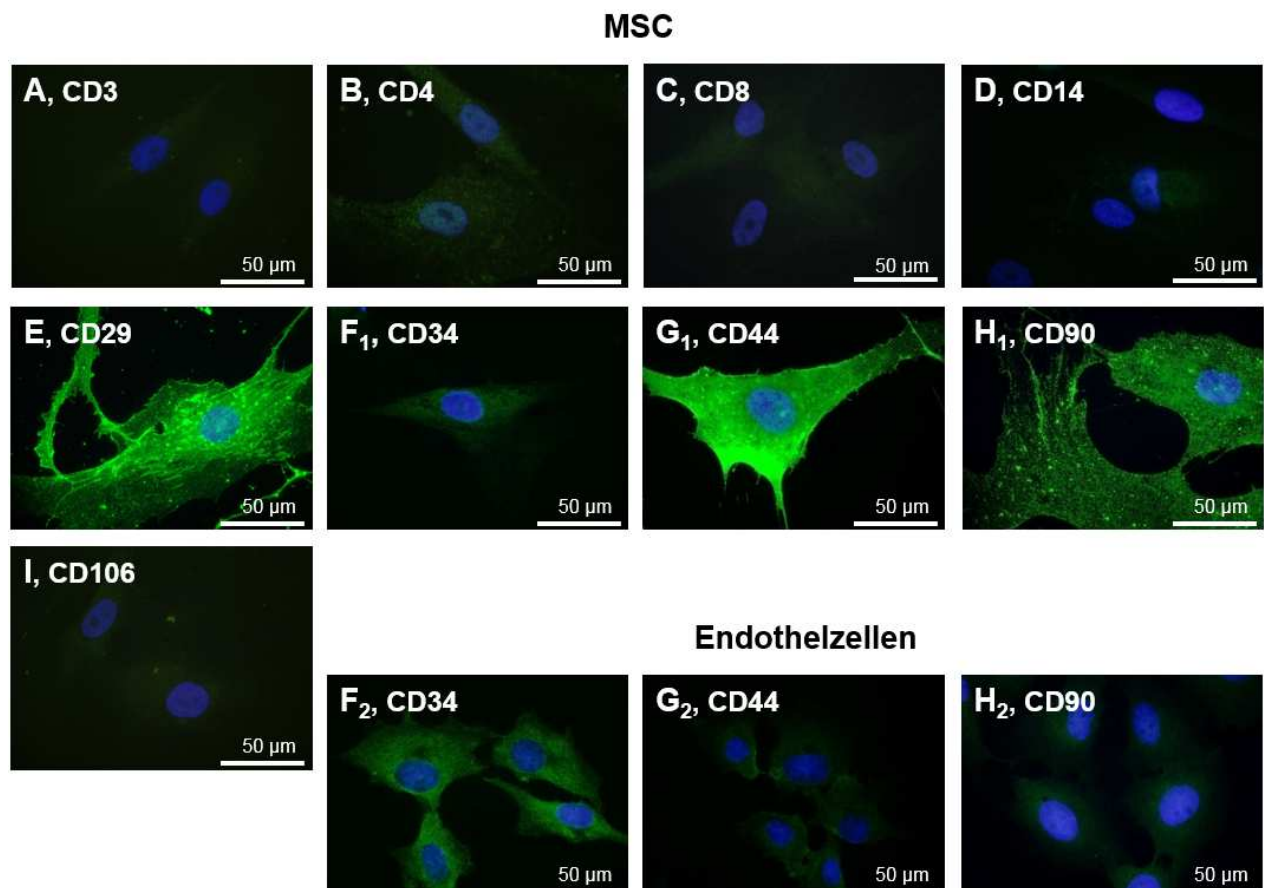


Abbildung 7: Immunhistologische Charakterisierung der MSCs. Oberflächenproteine wie Leukozytenmarker CD3 (A); CD4 (B); CD8 (C); CD14 (D); Zelladhäsionsprotein CD29 (E); Endothelzellmarker CD34 (F₁, F₂); Hyaluronsäurerezeptor CD44 (G₁, G₂); CD90 (H₁, H₂); und CD106 (I) sind durch die immunhistologische Färbung dargestellt (grün). Humane Endothelzellen (PAEICKR-Zelllinie) wurden auf die Expression von CD34 (F₂), CD44 (G₂) und CD90 (H₂) als Kontrolle untersucht. Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, blau).

6.2 Multipotenznachweis

Die MSCs wurden als 2D – Kultur in adipogenen und osteogenen Differenzierungsmedium für 14, 21 und 28 Tage kultiviert. Parallel wurden die MSCs als Kontrolle mit MSC – Wachstumsmedium versorgt. Der Multipotenznachweis erfolgte mit der histologischen Färbung.

Die adipogen differenzierten Zellen zeigten multiple, größenunterschiedliche, Ölrot-positive Fettvakuolen, die bereits bei den nativen Aufnahmen zu erahnen waren (Abbildung 8). Die positive Ölrotfärbung spricht für eine vermehrte Synthese der Lipide und damit eine positive adipogene Differenzierung der MSCs.

Für den Nachweis der osteogenen Differenzierung der MSCs wurde die von Kossa Färbung angewendet. Es zeigten sich im Vergleich zu undifferenzierten MSCs längliche, bipolare, granuliert und von Kossa positive Zellen (Abbildung 8). Die schwarzen Ablagerungen sprechen für die durch Silbernitrat reduzierten Kalziumsalze, die bei der Osteogenese freigesetzt werden. Zusammen mit der veränderten Morphologie der MSCs sprechen diese Ergebnisse für eine osteogene Differenzierung.

Alle chondrogen differenzierten 3D – Kulturen zeigten in der Genexpressionsanalyse und in der immunhistologischen Färbung eine Expression der typischen Knorpelmarker.

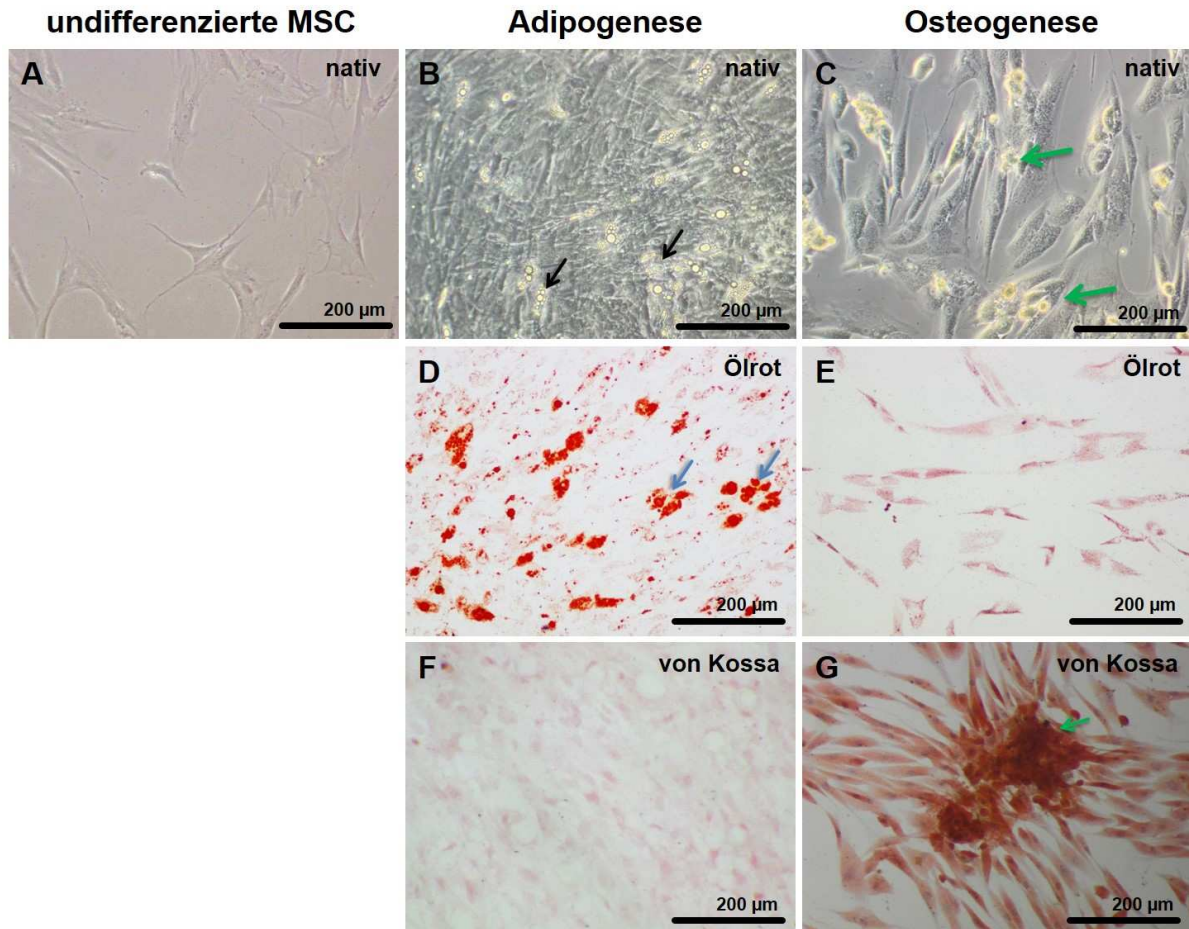


Abbildung 8: Multipotenznachweis. Adipogene und osteogene Differenzierung der MSCs. Mikroskopische Darstellung der undifferenzierten (A), adipogen (B, D, F) und osteogen (C, E, G) differenzierten MSCs in einer Monolayerkultur. Die dargestellten Bilder stammen von einem exemplarischen Spender. Die Differenzierung dauerte in dem Fall 21 Tage. Die adipogen differenzierten MSCs entwickelten die typischen Fettvakuolen (B, D), die Ölrot positiv waren (D, blaue Pfeile). Die osteogene Differenzierung führte zur Formänderung der Zellen. Die MSCs zeigten eine längliche granuliert Zellform. Die differenzierten Zellen (C, E, G) waren von Kossa positiv (G) und bildeten stellenweise extrazelluläre Matrix (C, G, grüne Pfeile).

6.3 IL-10 – Rezeptor und IL-10 Expression

Um die potentielle Sensibilität der MSCs gegenüber IL-10 zu überprüfen erfolgte eine immunzytochemische Färbung der undifferenzierten und nichtstimulierten MSCs in der 2D – Kultur. Im Vergleich zur Kontrollfärbung zeigte sich sowohl eine zytoplasmatische Expression des IL-10 – Rezeptors als auch des IL-10 selbst, wobei auch eine starke Fluoreszenz bei der IL-10-Färbung in den zytoplasmatischen Zellfortsätzen detektiert wurde (Abbildung 9).

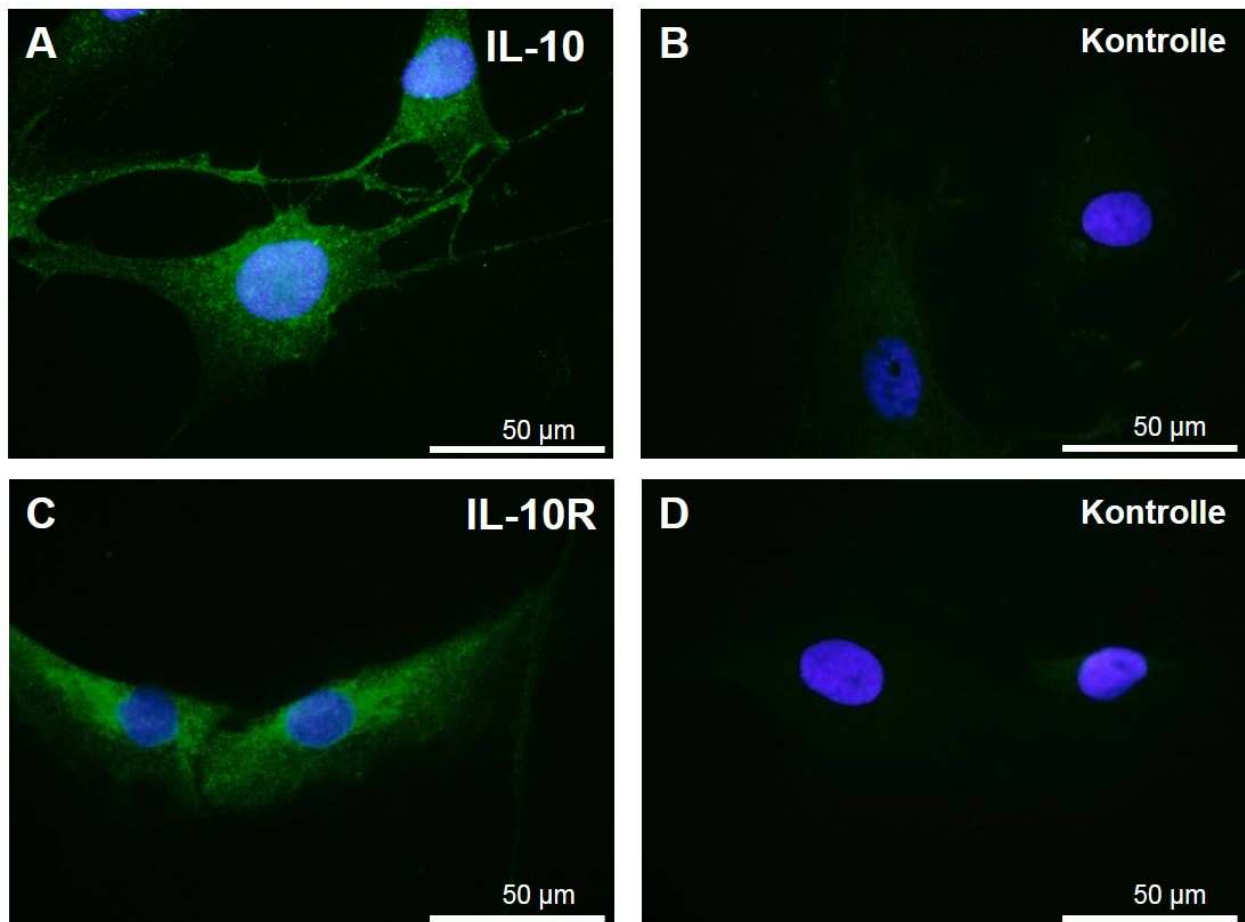


Abbildung 9: IL-10- und IL-10-Rezeptorexpression in undifferenzierten MSCs. Die MSCs wurden in einer Monolayerkultur auf IL-10 (A) und IL-10R (C) immunzytochemisch untersucht (grün). Die Abbildungen B und D stellen die Isotypkontrollen dar. 4 Spender wurden exemplarisch untersucht und ein repräsentatives Experiment ist dargestellt. Die Zellkernfärbung erfolgte mittels 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, blau).

6.4 STAT1 und STAT3 Expression

Eine 5-minütige Stimulation mit IL-10 führte bereits zu einer Expression von STAT3 in MSCs. Die Expression blieb konstant unabhängig von Dauer der Stimulation. Die 15- und 30-minütige Stimulation führte im Vergleich zur Kontrolle zwar zu einer Expression von STAT1, aber im Gegensatz zu STAT3 war dieses Protein nur spärlich exprimiert (Abbildung 10).

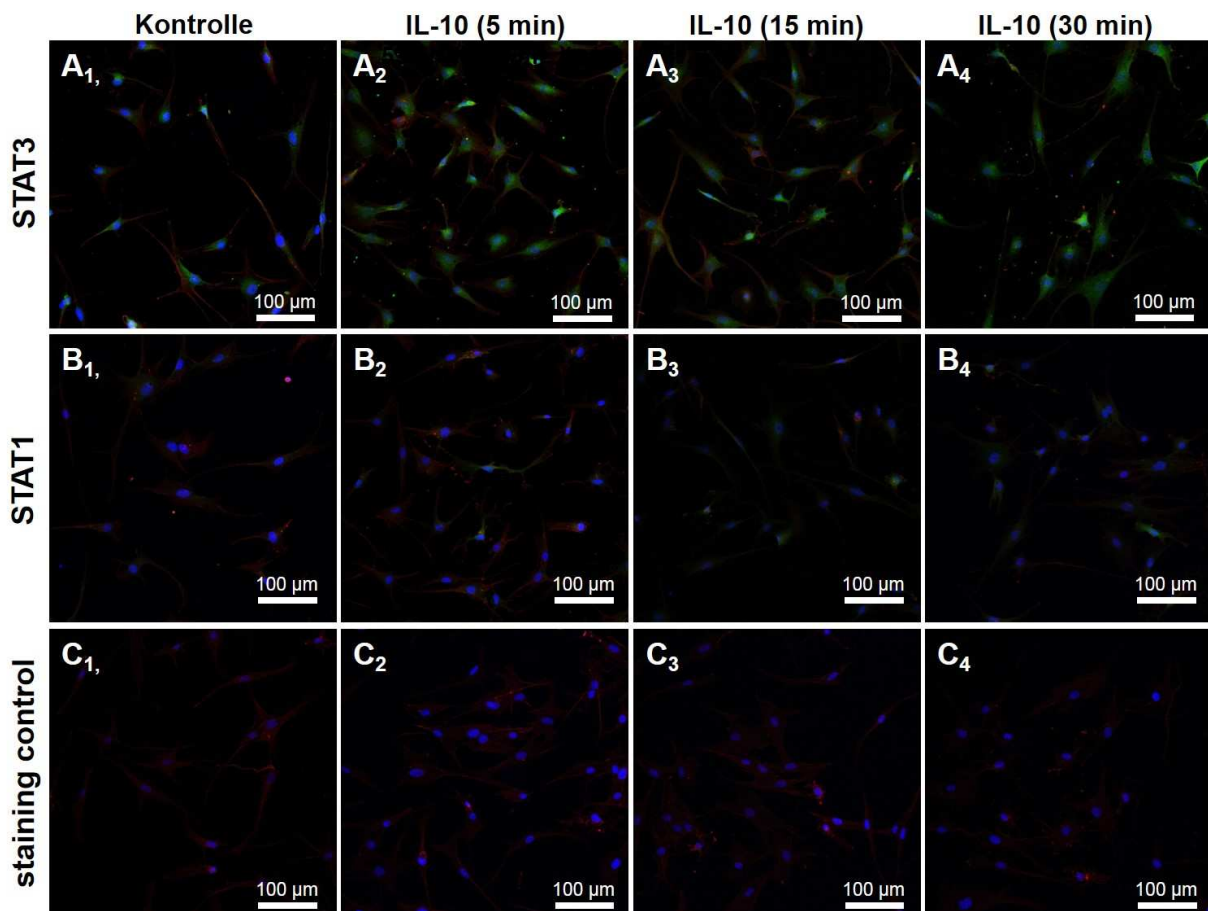


Abbildung 10: STAT1 und STAT3 Expression unter Stimulation mit IL-10. Die undifferenzierten MSCs wurden in einer Monolayerkultur für 5 min, 15 min und 30 min mit IL-10 stimuliert. Direkt danach erfolgte eine immunzytochemische Färbung (grün) für STAT3 (A1–A4) und (rot) für STAT1 (B1–B4). Als Kontrolle diente eine Färbung ohne Primärantikörper (C1–C4). Die Zellkernfärbung erfolgte mittels 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, blau). Die dargestellten Bilder zeigen die Ergebnisse von einem von zwei untersuchten Spendern.

6.5 Struktur der 3D – Kulturen

6.5.1 Makroskopische Struktur

Nach 14 Tagen Kulturdauer stellten sich die Massenkulturen als erhabene Strukturen mit einem Randwall und zentraler Vertiefung dar. (Abbildung 11). Im Unterschied zu anderen 3D – Kulturen wurde subjektiv bei allen Spendern eine eher flächige Form der mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierten, chondrogen differenzierten Kulturen beobachtet. Die nicht differenzierten Massenkulturen blieben gelb, wobei die differenzierten Massenkulturen eine orange – rötliche Verfärbung aufwiesen. Alle 3D-Kulturen konnten ihre Form über die 14 tägige Kultivierung einhalten.

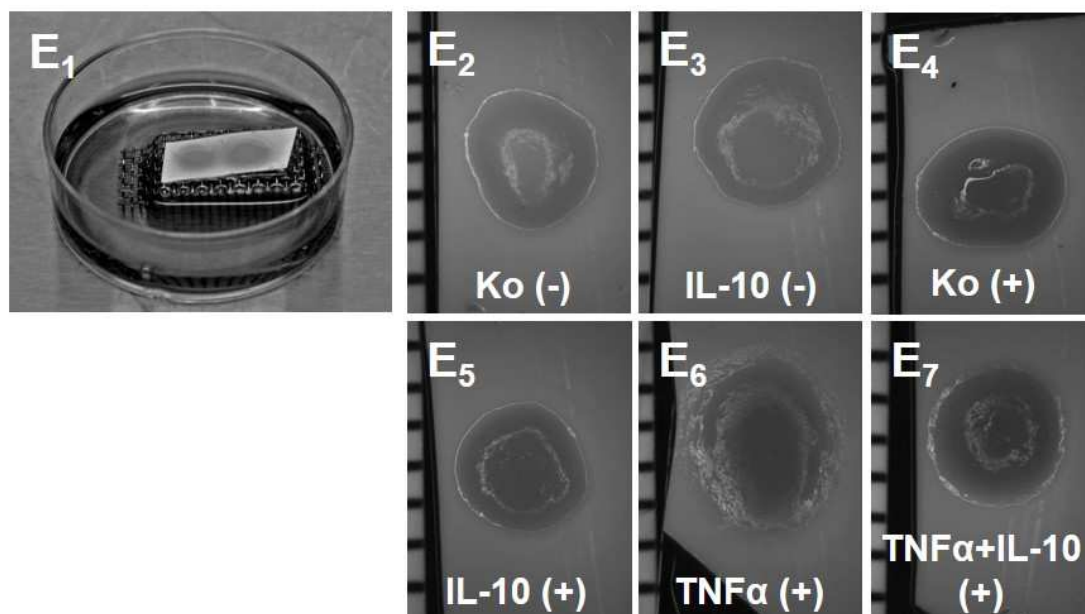


Abbildung 11: Repräsentative 3D-Kulturen. Die MSC-Massenkulturen wurden insgesamt 14 Tage chondrogen differenziert. Ab dem 7. Tag der Differenzierung erfolgte eine Stimulation mit jeweils 10 ng/ml IL-10, $\text{TNF}\alpha$ und IL-10 mit $\text{TNF}\alpha$. Die Abbildung E1 zeigt eine exemplarische Darstellung des Versuchsmodells. Eine 3D-Kultur auf einem Zellulosefilter und Metallgitterbrücke. E2 zeigt eine undifferenzierte und nicht stimulierte, E3 eine undifferenzierte und mit IL-10 stimulierte, E4 eine differenzierte und nicht stimulierte, E5 eine differenzierte und mit IL-10 stimulierte, E6 eine differenzierte und mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierte und E4 eine differenzierte, mit IL-10 und $\text{TNF}\alpha$ stimulierte MCS-3D-Kultur.

6.5.2 Mikroskopische Struktur

Die allgemeine Übersichtsdarstellung erfolgte mittels HE – Färbung. (Abbildung 12). In allen gefärbten Massenkulturen zeigten sich unterschiedliche Zellschichten. Die Zelldichte in der äußeren Zone war höher als im Zentrum der Massenkultur und die Zellen und die Zellkerne dort nahmen längliche Form an. Eine stärkere Schichtung wurde in den undifferenzierten 3 D – Kulturen (Kontrolle) verglichen mit den differenzierten beobachtet. Die AB – Färbung diente der Darstellung von Proteoglykanen (Abbildung 12). Wie erwartet zeigten die chondrogen differenzierten Massenkulturen eine diffuse bläuliche Verfärbung. Aber auch die nicht differenzierten MSC-Kulturen wiesen Proteoglykane auf.

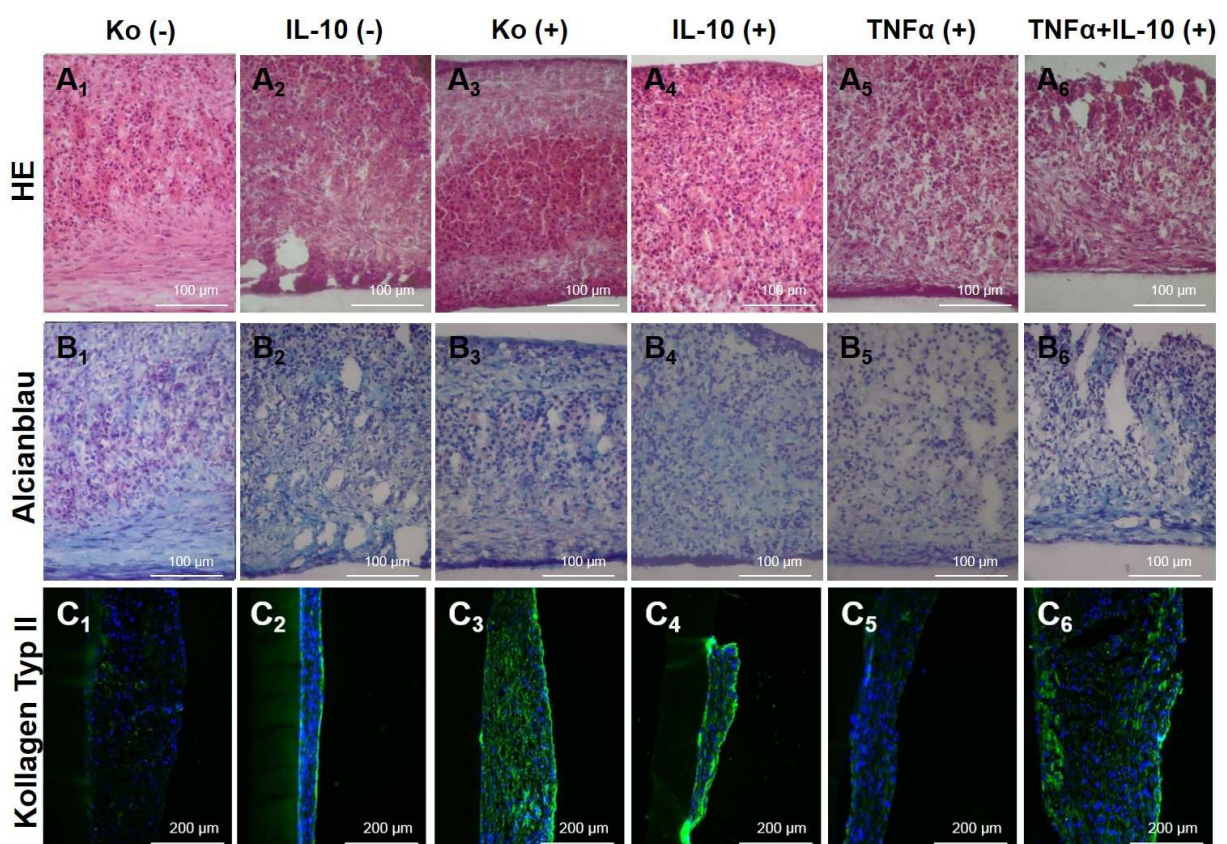


Abbildung 12: Histologie und immunhistologische Kollagen Typ II Färbung der MSCs in 3D-Kulturen. Es erfolgte eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (A1-6). Eine proteoglykanspezifische Färbung, Alcianblau, ist in der zweiten Reihe von oben dargestellt (B1-6). Die dritte Bilderreihe zeigt eine immunhistologische Kollagen Typ II Färbung der 3D-Kulturen (grün, C1-6). Zellkernfärbung erfolgte mittels 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI, blau). Kulturen von n=3 Spendern wurden untersucht. Die

dargestellten HE, Alcianblau und Kollagen Typ II Bilder stammen von jeweils einem exemplarischen Spender.

6.6 Genexpressionsanalyse

Mit der relativen Expressionsanalyse der typischen Knorpelmarker wurde die Fähigkeit der chondrogenen Differenzierung einer Massenkultur unter Stimulation mit Zytokinen untersucht. Die Massenkulturen wurden für insgesamt 14 Tage chondrogen differenziert. Eine Stimulation mit IL-10 oder mit TNF α , bzw. deren Kombination wurde in den letzten 7 Tagen der Untersuchungen eingeführt. Als Kontrolle dienten die undifferenzierten, nichtstimulierten und undifferenzierten, mit IL-10 stimulierten Kulturen. Es wurde jedoch keine Signifikanz erreicht. Die alleinige Stimulation mit IL-10 und die alleinige Stimulation mit TNF α induzierten eine erhöhte Expression des Kollagens Typ II, Aggrecans und sox9. Die Expression der typischen Knorpelmarker war tendenziell unter der IL-10-Stimulation höher.

6.6.1 Expression von Kollagen Typ II

Die Stimulation mit IL-10 induzierte im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollen eine höhere Expression des Kollagens Typ II (Abbildung 13). Die Stimulation mit TNF α allein und mit der Kombination aus IL-10 und TNF α erbrachte ebenfalls eine höhere Expression des Kollagens Typ II, jedoch geringer als bei der alleinigen Stimulation mit IL-10. Die beschriebenen Unterschiede erreichten nicht das Signifikanzniveau. Die Ergebnisse zeigten Übereinstimmung mit der immunhistologischen Färbung (Abbildung 12).

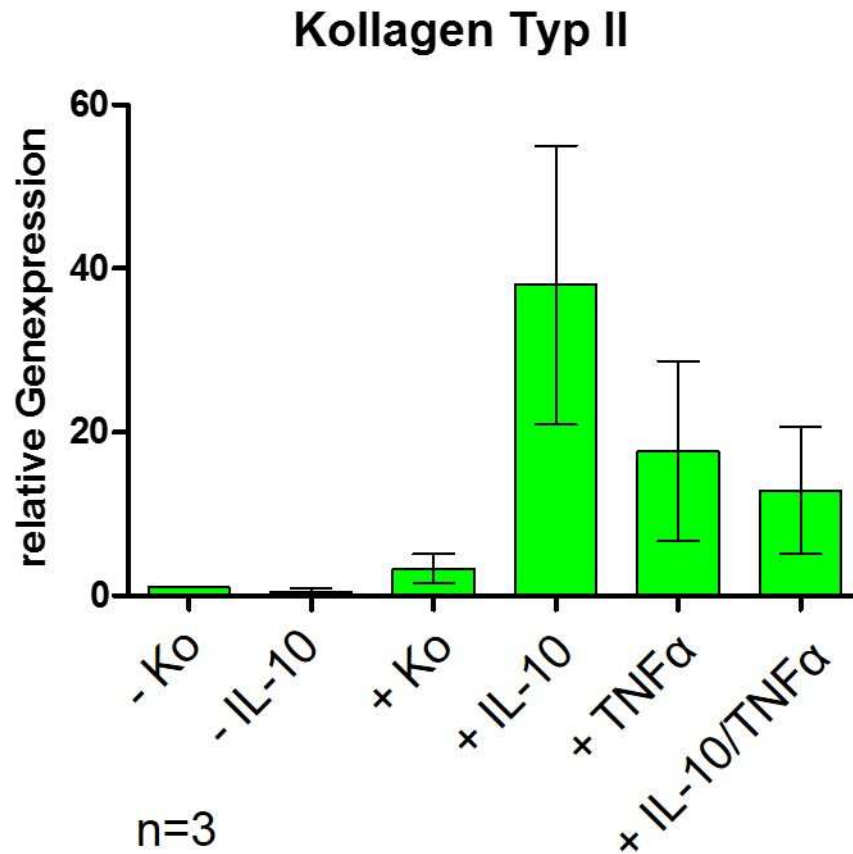


Abbildung 13: Relative Genexpression von Kollagen Typ II in MSCs 3D-Kulturen. Die Genexpression wurde mittels Realtime PCR ermittelt. β -Aktin diente als Housekeeping Gen. Die MSCs wurden für insgesamt 14 Tage chondrogen differenziert. Eine Stimulation mit IL-10, TNF α oder IL-10 mit TNF α erfolgte in den letzten 7 Tagen. Als Kontrolle dienten die undifferenzierten 3D-Kulturen (-). n=3.

6.6.2 Expression von Aggrekan

Ähnlich wie bei der Kollagen Typ II Expression zeigte sich ein Anstieg der Aggrekanexpression bei der alleinigen Stimulation mit IL-10 im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollen. TNF α induzierte im Vergleich zur nichtstimulierten differenzierten Kontrolle keine Aggrekanexpression. Die Expression des Aggrekans wurde von der Kombinationsstimulation aus TNF α und IL-10 nicht beeinflusst (Abbildung 14). Die beschriebenen Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

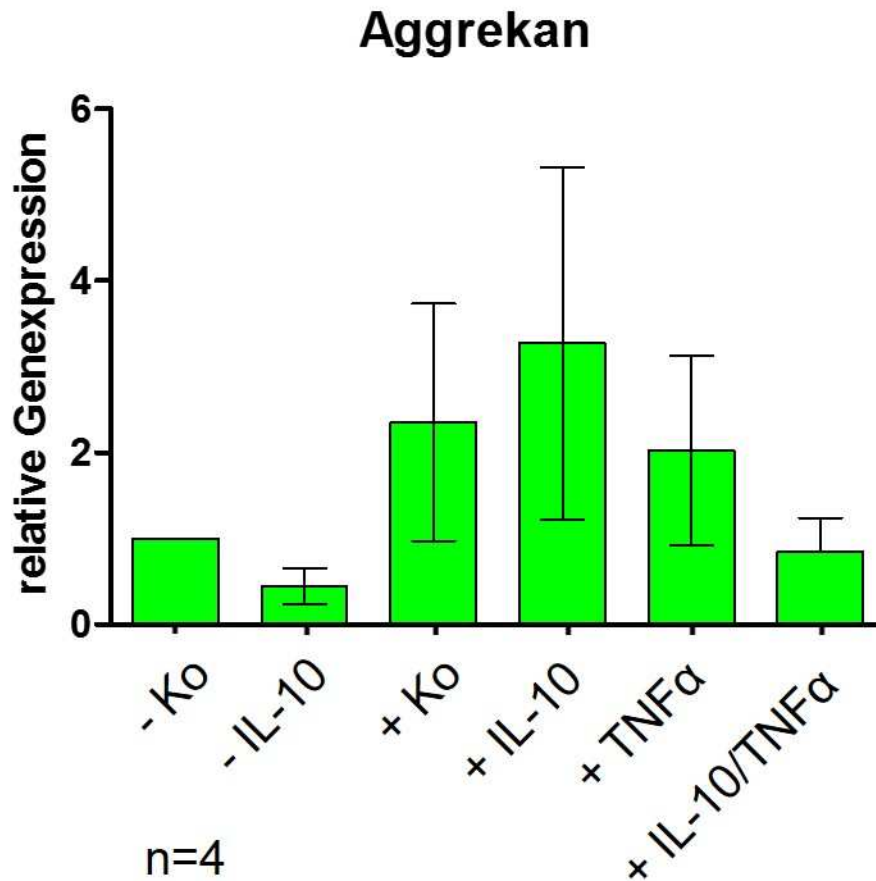


Abbildung 14: Relative Genexpression von Aggrekan in MSCs 3D-Kulturen. Die Genexpression wurde mittels Realtime PCR ermittelt. β -Aktin diente als Housekeeping Gen. Die MSCs wurden für insgesamt 14 Tage chondrogen differenziert. Eine Stimulation mit IL-10, TNF α oder IL-10 mit TNF α erfolgte in den letzten 7 Tagen. Als Kontrolle dienten die undifferenzierten 3D-Kulturen (-). n=4.

6.6.3 Expression von sox9

Eine deutlich erhöhte sox9 Expression zeigte sich nur unter der Stimulation mit TNF α . Sowohl die Kombination mit IL-10, als auch die alleinige IL-10 Stimulation konnten im Vergleich zur nichtstimulierten differenzierten Kontrolle die sox9 Expression kaum beeinflussen (Abbildung 15). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

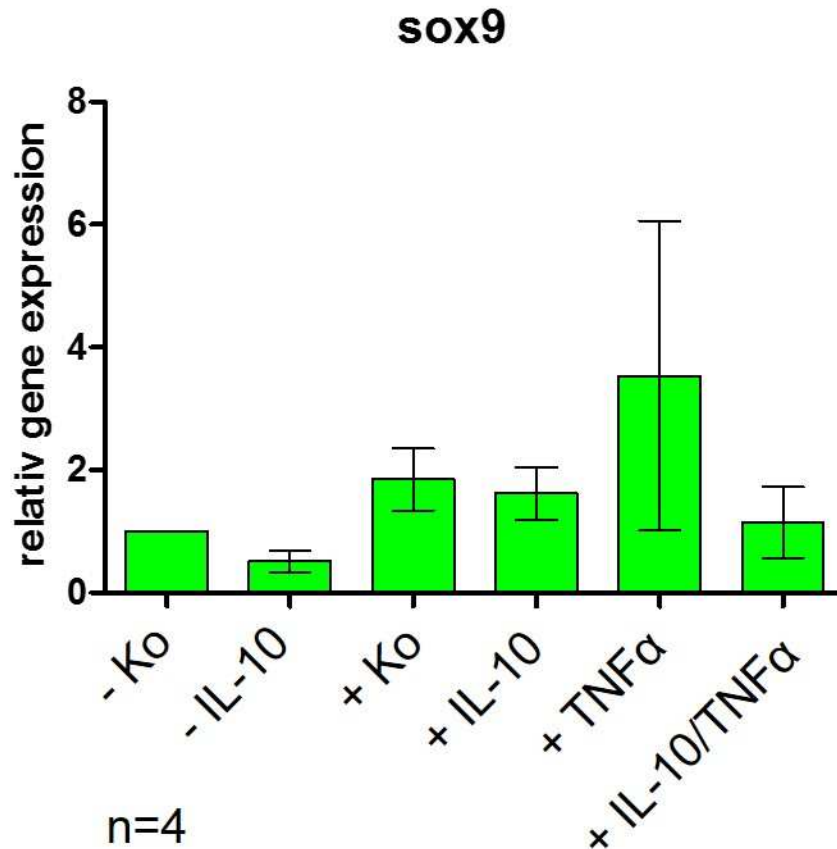


Abbildung 15: Relative Genexpression von sox9 in MSCs 3D-Kulturen. Die Genexpression wurde mittels Realtime PCR ermittelt. β -Aktin diente als Housekeeping Gen. Die MSCs wurden für insgesamt 14 Tage chondrogen differenziert (+). Eine Stimulation mit IL-10, TNF α oder IL-10 mit TNF α erfolgte in den letzten 7 Tagen. Als Kontrolle dienten die undifferenzierten 3D-Kulturen (-). n=4.

6.6.4 Expression von TNF α

Eine erhöhte TNF α Expression wurde nur unter der Stimulation mit IL-10 detektiert. Sowohl die Stimulation mit TNF α , als auch die Kombination mit IL-10 zeigten keinen Anstieg der TNF α Expression (Abbildung 16).

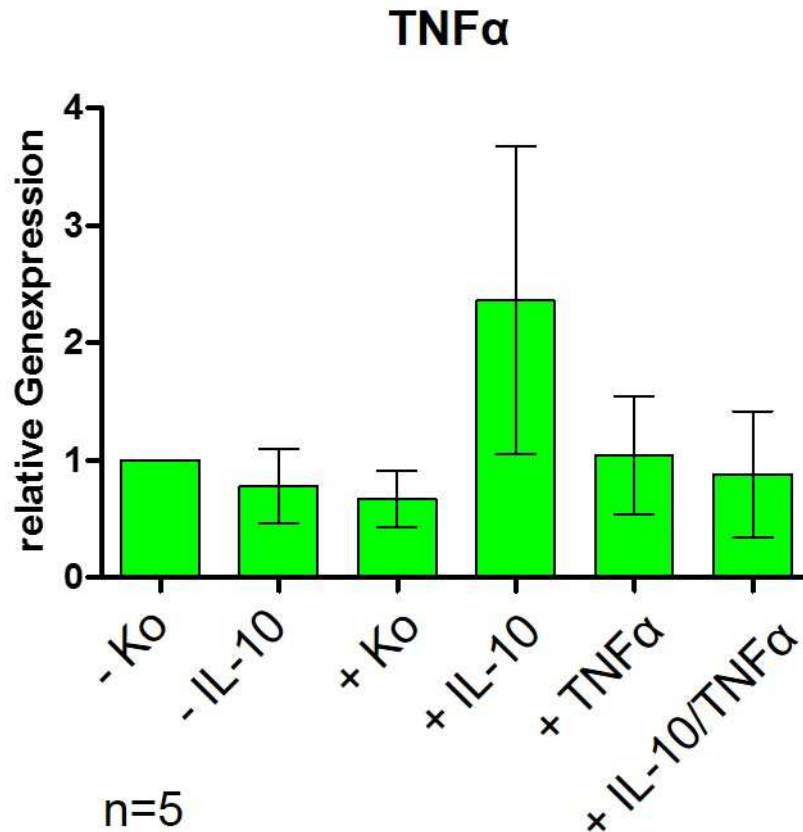


Abbildung 16: Relative Genexpression von TNF α in MSCs 3D-Kulturen. Die Genexpression wurde mittels Realtime PCR ermittelt. β -Aktin diente als Housekeeping Gen. Die MSCs wurden für insgesamt 14 Tage chondrogen differenziert. Eine Stimulation mit IL-10, TNF α oder IL-10 mit TNF α erfolgte in den letzten 7 Tagen. Als Kontrolle (normalisiert) dienten die undifferenzierten 3D-Kulturen (-). n=5.

6.6.5 Expression von typischen Knorpelmarkern im Vergleich zu frisch isolierten Chondrozyten

Die chondrogene Differenzierung von MSCs wurde auch in PGA – Kulturen untersucht. Es handelt sich um ein bioresorbierbares Trägermaterial aus Polyzucker (Polyglykolsäure = PGA), der bereits im klinischen Alltag angewendet wird [87, 88]. Es wurde die Genexpression von Kollagen Typ II, Aggrekan und sox9 in den PGA – MSC – Kulturen und in den frisch isolierten Chondrozyten untersucht.

In dieser Arbeit wurden die Genexpressionsanalysen von 3D – Kulturen mit den Analysen von PGA – Kulturen in Bezug auf frisch isolierte Chondrozyten verglichen. Zwischen den beiden Kulturen gab es keine signifikanten Unterschiede, jedoch war die

Genexpression in den 3D-Kulturen im Vergleich zu frisch isolierten Chondrozyten bei allen getesteten Knorpelmarkern signifikant kleiner (Abbildung 16).

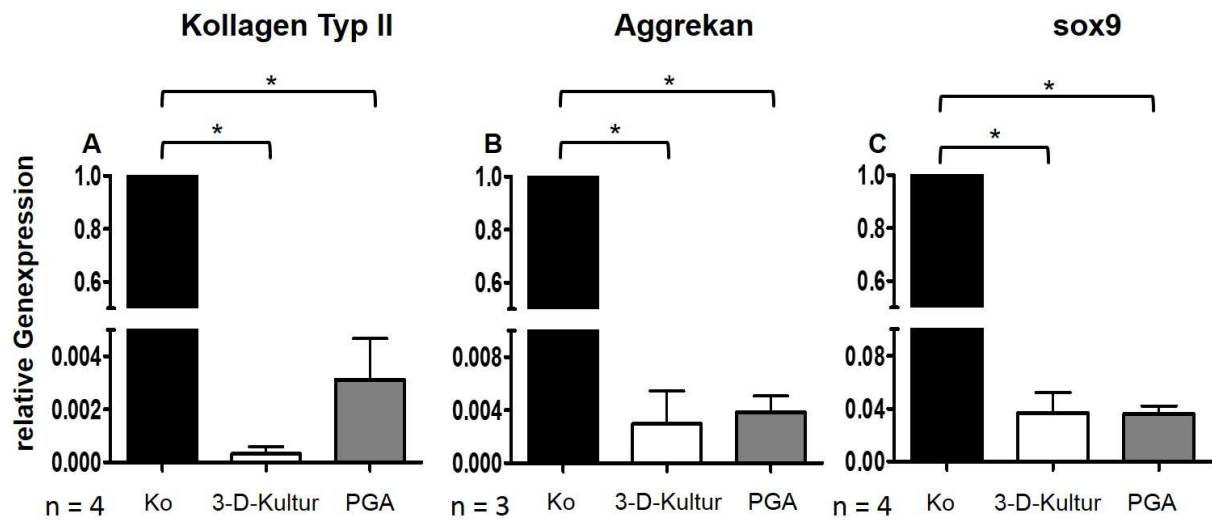


Abbildung 17: Relative Genexpressionsanalysen der MSCs in 3D- und PGA-Kultur im Vergleich zu frisch isolierten Chondrozyten (Ko, normalisiert). Die Genexpression wurde mittels Realtime PCR ermittelt. β -Aktin diente als Housekeeping Gen. Die MSCs in den beiden Kultursystemen wurde für 14 Tage chondrogen differenziert. A: Kollagen Typ II, B: Aggrekan, C: sox9. n = 3-4 , * = $p < 0,005$.

7. Diskussion

Sowohl degenerative als auch traumatische Knorpeldefekte stellen ein wesentliches Problem in der Unfallchirurgie und Orthopädie dar. Die Hauptsymptome einer fortgeschrittenen Gelenkknorpeldegeneration sind belastungsabhängige Schmerzen und Bewegungseinschränkung. Die Patienten klagen über stärkste Schmerzen, die nach Wiederaufnahme einer Bewegung nach einer langen Ruhephase auftreten. Mit der Progression der Arthrose wird auch die Gehstrecke des Patienten zunehmend reduziert. Dieses schränkt nicht nur die Lebensqualität der Patienten ein, sondern kann durch eine zunehmende Immobilität bei älteren Patienten zur Begleiterkrankungen führen [89]. Heutzutage ist die Arthroplastik die *ultima ratio* zur Behandlung der Arthrose bei geriatrischen Patienten, wobei nicht alle Gelenktypen für einen endoprothetischen Ersatz geeignet sind. Je nach Indikation werden am häufigsten die Hüft- und Kniearthroplastiken durchgeführt [48, 90-92]. Bei jungem Patientengut sind die Behandlungsmöglichkeiten aufgrund der hohen Ansprüche an Mobilität sehr limitiert. In diesem Fall führt eine Arthroplastik nicht zu einer Verbesserung der Gelenkfunktion oder der Lebensqualität. Zur Behandlung von kleinen Knorpeldefekten bei jungen Patienten (<40 Jahre) können knochenmarkstimulierende operative Methoden wie Mikrofrakturierung oder Anbohrungen angewandt werden [93]. Leider wird dabei ein Faserknorpel gebildet und aufgrund der veränderten Biomechanik und geminderter Belastbarkeit kommt es zur rascher Verschlechterung der klinischen Ergebnisse [93]. Eine weitere Therapieoption für die Behandlung der chondralen Defekte ist die autologe Chondrozytentransplantation. Dabei werden die Chondrozyten aus einer kleinen Knorpelprobe isoliert, *in vitro* expandiert und in die Defektfläche implantiert. Für größere Knorpeldefekte können die expandierten Chondrozyten auf einem Trägermaterial implantiert werden [45]. Jedoch werden diese Methoden bei arthrotischen Defekten nicht angewendet und die klinischen Ergebnisse sind noch nicht zufriedenstellend [55, 56]. Um diese Technik auch für die Füllung arthrotischer Defekte nutzbar zu machen, ist ein besseres Verständnis des Einflusses inflammatorischer Mediatoren auf die Knorpelheilung erforderlich. Die Arthrose wird hauptsächlich durch TNF α und dadurch vermittelte Induktion von sekundären pro-inflammatorischen Zytokinen induziert [45, 62]. In dieser Arbeit stellt die Stimulation mit TNF α ein vereinfachtes Modell der Inflammation in einem arthrotischen Gelenk dar. Im Gegensatz dazu können MSCs

entzündungshemmende Faktoren freisetzen sowie immunmodulatorische Prozesse bewirken. Chondrogen differenzierte MSCs könnten eine Option für die MACT bieten. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von pro-inflammatorischen TNF α und von anti-inflammatorischen IL-10 auf die chondrogene Differenzierung der MSCs in einer 3D-Kultur. TNF α repräsentiert im angewendeten Zellkulturmodell einen inflammatorischen Schlüsselmediator im Arthrosegeschehen. Es ergibt sich die Frage, ob IL-10 die Wirkung von TNF α direkt modulieren kann und gleichzeitig die Chondrogenese beeinflusst.

Die in dieser Arbeit angewandte MSC-Isolierungsmethode erwies sich als verlässlich. Aus dem spongiösen menschlichen Femurknochen konnten reine MSCs gewonnen werden. Um das zu beweisen wurden nicht nur die plastikadhärenten Zellen direkt genutzt, sondern es erfolgte zusätzlich die Bestimmung von immunphänotypischen Oberflächenproteinen (im englischen Sprachraum CD, cluster of differentiation, genannt). Zurzeit gibt es kein für MSCs spezifisches Oberflächenprotein, sodass mehrere CDs bestimmt werden müssen. Die isolierten Zellpopulationen exprimierten CD29, CD44 und CD90. Diese Oberflächenproteine sind an der interzellulären Interaktion und der Interaktion zwischen der Zelle und der Matrix in multiplen Gewebetypen beteiligt [94, 95]. CD90, auch Thy-1 genannt, wird auch an den Thymozyten exprimiert und ist an der Aktivierung von T-Lymphozyten beteiligt [96]. Die Expression von diesen Oberflächenproteinen wird in der Literatur auch als spezifisch für MSCs beschrieben, was in dieser Studie bestätigt werden konnte [10, 11, 97].

Eine Verunreinigung der Kultur durch Blutzellen wie Lymphozyten oder Makrophagen konnte durch den fast negativen Nachweis von CD3, CD4, CD8 und CD14 ausgeschlossen werden. Diese Proteine gelten unter anderem als Leukozytenmarker [10, 11]. Die isolierten MSCs waren ebenfalls, wie in der Literatur beschrieben, CD34 negativ [10, 12, 13]. CD34 ist ein Oberflächenmolekül, dessen Rolle noch nicht vollständig erforscht ist. Dieses Protein wird aber von den Zellen der hämatopoetischen Stammzelllinie exprimiert und kann dadurch u.a. zur Vorbereitung der Knochenmarktransplantation angewandt werden. Ein signifikanter Anteil an CD34 positiven Zellen gilt häufig als Kontamination mit einer hämatopoetischen Zellfraktion. Es wird angenommen, dass CD34 an der Migration und Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen beteiligt ist [98, 99]. Die Expression von CD34 kann aber, sowohl abhängig von der Passage als auch vom Ursprung der MSCs variieren. Aus dem Fettgewebe gewonnene Stammzellen können in den ersten Passagen CD34

exprimieren [100-102]. Weiterhin wurde die Expression von CD106 untersucht. Es zeigte sich eine starke Variabilität in der CD106 Expression unter den untersuchten Spendern. Der Mittelwert betrug 44,13% (SD±28,8%). CD106 ist an der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen beteiligt. Die Expression wird durch bestimmte Zytokine, wie zum Beispiel TNF α , beeinflusst [103, 104]. Die Rolle dieses Proteins für die MSCs bleibt unklar. In der Literatur ebenso wie in dieser Arbeit, wird eine starke Variation der Expression unter den Spendern beobachtet [10, 105-107]. Die durchflusszytometrischen Analysen korrelierten mit den immunzytochemischen Markierungen.

Die Attraktivität der MSCs für regenerative Therapien beruht vor allem auf der Multipotenz dieser Zellen. In einem angepassten Milieu sind die MSCs fähig sich in verschiedene mesenchymale Zelllinien zu differenzieren. Dadurch können sie potenziell in verschiedenen medizinischen Fachdisziplinen wie experimentelle Kardiologie, Angiologie oder Dermatologie angewandt werden [2, 108, 109]. Um die Multipotenz der isolierten Zellen nachzuweisen erfolgte die Kultivierung in adipogenen und osteogenen Differenzierungsmedien. Die Unterschiede zwischen den Kulturen konnten bereits anhand von ungefärbten Präparaten beobachtet werden. Im Vergleich zu undifferenzierten 2D-Kulturen zeigten die adipogen differenzierten Zellen eine eher rundliche Form mit großen intrazellulären Vakuolen. Die osteogen differenzierten Zellen nahmen eine längliche, schmale Form an. Darüber hinaus fanden sich multiple Granula im Intrazellulärraum. Mit Hilfe einer Ölrot-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass in den adipogen differenzierten Zellen Fettvakuolen vorhanden waren. Die osteogen differenzierten Zellen waren in der von Kossa Färbung positiv.

Die isolierten plastikadhärenten Zellen exprimierten ein für MSCs typisches CD-Muster und sie waren multipotent. Eine Kontamination mit Leukozyten oder hämatopoetischen Stammzellen konnte ausgeschlossen werden. In Korrelation mit der Literatur handelt es sich bei den isolierten Zellen um multipotente MSCs [2].

Ein arthrotisches Gelenk weist sowohl histologisch als auch makroskopisch im Vergleich zum gesunden Gelenk einen degenerierten Knorpel auf. Eine Migration der MSCs wird durch diese Degeneration unterstützt [110, 111]. Bei einem Gelenktrauma kommt es zu einem Anstieg von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF α . Größere Konzentrationen dieser Zytokine werden auch in den Gelenken von Patienten mit posttraumatischer Arthrose detektiert. Dieses inflammatorische Milieu kann einen

Einfluss auf die potentielle Regeneration des Knorpels haben. TNF α scheint in diesem Prozess eine wichtige Rolle zu spielen [45, 112].

Manche Autoren beschreiben einen osteoinduktiven Effekt des TNF α auf die MSCs [82, 113]. Dieses Zytokin ist aber auch in der Lage die chondrogene Differenzierung der MSCs zu blockieren. Die Hemmung der Chondrogenese erfolgt über die Aktivierung von NF- κ B. Der genaue Signaltransduktionsweg bleibt jedoch unklar [84, 114]. Eine Hemmung der chondrodestruktiven Wirkung des TNF α könnte eine wichtige Rolle in der Arthrosebehandlung spielen. Mittlerweile sind TNF α -Inhibitoren wie zum Beispiel Adalimumab in der Medizin etabliert. Krankheiten wie rheumatoide Arthritis oder *colitis ulcerosa* können mithilfe von TNF α -Blockern erfolgreich behandelt werden. Es konnten langjährige Remissionen und eine subjektive Verbesserung der Lebensqualität erreicht werden [83, 84, 115, 116].

IL-10 gilt als ein typisches anti-inflammatorisches Zytokin und weist anti-apoptotische Eigenschaften in den humanen Chondrozyten auf. Es hat eine antagonistische Wirkung zur TNF α [117]. Die Studienlage bleibt unklar bezüglich der Wirkung von IL-10 auf die Knorpelschicht in einem arthrotischen Gelenk. Es soll zwar einen protektiven Effekt haben, es werden aber nicht nur hohe Konzentrationen an TNF α bei Arthrose, sondern auch an IL-10 nachgewiesen. Es scheint, dass diese beiden Zytokine in direkter Korrelation zueinander stehen [118, 119]. Die Expression von IL-10 wurde auch in verschiedenen Typen von mesodermalen Zellen nachgewiesen [19, 120, 121]. In *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass die MSCs in der Lage sind die Sekretion von IL-10 in den Lymphozyten zu beeinflussen, beziehungsweise zu stimulieren [73, 122]. Erhöhte Konzentrationen an IL-10 wurden auch in MSC – Kulturen unter hypoxischen Bedingungen detektiert. Die Autoren implizieren, dass ein zellprotektiver Effekt von IL-10 möglich wäre [123], jedoch bleibt ein direkter Einfluss noch unklar. Um nachzuweisen, dass IL-10 potenziell einen direkten Einfluss auf die MSCs haben könnte, erfolgte zunächst die Bestimmung der Expression des IL-10R in MSCs mittels Immunzytochemie. Diese Untersuchung war erfolgreich, die undifferenzierten MSCs in 2D-Kulturen exprimierten IL-10R. Diese Eigenschaft ist mit den artikulären Knorpelzellen vergleichbar. Die Expression von IL-10 und IL-10R wird typischerweise in den Chondrozyten und Synovialfibroblasten beobachtet [70].

Zusätzlich konnte eine Expression von STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription3) in den undifferenzierten MSCs nachgewiesen werden. STAT3 gilt als regulatorischer Transkriptionsfaktor und aktiviert Expression von diversen Proteinen.

Einige MSCs exprimierten STAT3 nach kurzer Stimulation mit IL-10. Diese Wirkung wurde auch bereits in der Literatur beschrieben [70]. Im Gegensatz zur STAT3 wurde STAT1 erwartungsgemäß nur gering exprimiert, eine Expression von STAT1 wird hauptsächlich durch Interferone moduliert [124].

In den Versuchen konnte eine homogene MSC-Zellmasse durch zweifache Zentrifugation gewonnen werden. Die Größe einer 3D-Zellkultur wurde an den Filter und an die Metallbrücke angepasst. Die Intention bei der Entwicklung des Zellkulturmodells war die Beschaffung eines Modells das möglicherweise ohne Anwendung von Fremdmaterial oder Trägermaterial die Knorpeldefekte füllen könnte. Ein Biomaterial könnte auf die Chondrogenese von MSCs Einfluss nehmen.

Bei der Präparation konnte eine Zellmasse auf einen Filter ohne Komplikationen aufgetragen werden. Die Kulturen behielt für 14 Tage ihre ovale Form.

Auch die histologische Untersuchung zeigte tendenziell höhere Mengen an Proteoglykanen in den chondrogen differenzierten Massenkulturen. Interessanterweise, führte die TNF α -Stimulation zur Bildung von großen Interzellulärräumen. Die makroskopische Struktur dieser Kulturen war instabil und führte häufig zu Problemen bei den diversen histologischen und immunhistologischen Färbungen. Die Kryoschnitte mit TNF α -behandelter Kulturen waren zerbrechlich und bei den Anfärbeversuchen fielen sie auseinander. Diese Strukturunterschiede könnten durch die hemmende Wirkung von TNF α auf die Synthese von Extrazellulärmatrix im Gelenkknorpel verursacht werden. TNF α ist in der Lage die Matrix-Metalloproteasen im Gelenkknorpel zu induzieren und aktivieren. Eine erhöhte Aktivität dieser Peptidasen führt zur Degradation der Extrazellulärmatrix in Chondrozyten [45, 69, 125].

Der größte Anteil an Matrixmolekülen im hyalinen Knorpel wird durch Kollagen Typ II und Aggrecan repräsentiert [126-128]. Außerdem ist Sox9 ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Chondrogenese [24]. Diese drei Knorpelmarker wurden zur Untersuchung der chondrogenen Differenzierung der Kulturen unter Stimulation mit IL-10 und TNF α gemessen. Die RNA-Isolierung aus 3D-Kulturen erwies sich als schwierig. Die ersten Versuche mit dem Isolations-Kit von der Firma Qiagen sind gescheitert. Die Mengen an RNA waren unzureichend und von schlechter Qualität. Es ist nicht ungewöhnlich, dass die RNA-Isolierung bei bestimmten Zelltypen insbesondere in der 3D-Kultur problematisch ist und ein adaptiertes RNA-Isolierungsprotokoll angewendet werden muss [129]. Hierfür könnte die hohe Dichte negativer Ladungen durch den hohen Proteoglykangehalt in der Knorpelmatrix verantwortlich sein. Die ausreichenden

Mengen an RNA aus 3D-Kulturen konnten erst mit dem Protokoll der Firma Epicentre gewonnen werden. Die mit IL-10 stimulierten Kulturen wiesen die höchste Expression an Kollagen Typ II und Aggrecan auf. Die Expression dieser Marker war unter der Stimulation mit pro-inflammatorischem TNF α und Doppelstimulation mit IL-10 und TNF α geringer. Diese Konstellation der Ergebnisse könnte für eine knorpelprotektive Wirkung des IL-10 sprechen. Es wäre auch vorstellbar, dass so eine Massenkultur kleine Knorpeldefekte decken kann, da wie bereits erwähnt die Massenkulturen ihre drei dimensionale Form für 14 Tage halten konnten und die Größe der jeweiligen Kultur bis zu einem gewissen Grad moduliert werden kann. Eine klinische Anwendung scheint ebenfalls umsetzbar zu sein. Die MSCs werden im klinischen Alltag aus dem Knochenmark durch einfache Aspiration gewonnen. Eine sterile Herstellung so eines biologischen Implantates und operative Implantation wäre nicht ausgeschlossen. Ein Problem in der Gewinnung von MSC-basierten Implantaten bestünde vermutlich in der benötigten Menge an MSCs. Einige Studien implizieren, dass eine lange Kultivierungszeit und eine hohe Passage die Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit der MSCs reduzieren. Jedoch wird eine signifikante Reduktion der Proliferation erst ab der 20. Passage beobachtet [130, 131]. Es bleibt jedoch weiterhin unklar, welchen Einfluss die Kultivierungszeit auf die Multipotenz der MSCs hat. Die Studie zeigte aber auch, dass die Unterschiede in der Expression der typischen Knorpelmarker zwischen den unterschiedlich stimulierten Massenkulturen relativ gering waren.

Erstaunlicherweise war die Expression von sox9 in den mit TNF α -stimulierten Massenkulturen am höchsten. Es wäre zu erwarten, dass ein pro-inflammatorisches Zytokin wie TNF α eine eher hemmende Wirkung auf die Expression eines Transkriptionsfaktors in der Chondrogenese hat. Diese Hypothese unterstützt auch die Studie von Murakami et al. in der Chondrozyten aus dem tierischen Knorpelgewebe untersucht wurden. TNF α zeigte dabei einen suppressiven Effekt auf die Expression von sox9 [114]. Jedoch wurden in dieser Arbeit, anders als in der Studie von Murakami et al., gesunde, menschliche MSCs in einer Massenkultur untersucht. Die weiteren Massenkulturen zeigten im Vergleich kaum Wirkung auf die Expression von sox9.

Die Expression von TNF α war in den mit IL-10-stimulierten Kulturen am höchsten. Eine Progression der Arthrose führt zu einem Anstieg nicht nur von TNF α aber auch von IL-10 [118]. Das impliziert auch eine gegenseitige Interaktion dieser beiden Zytokine. Die

weiteren Massenkulturen zeigten im Vergleich kaum Wirkung auf die Expression von TNF α .

Die Unterschiede zwischen den Stimulationsversuchen mit Zytokinen waren nicht signifikant. Im Rahmen einer Studie in unserer Arbeitsgruppe wurden frisch isolierte Chondrozyten untersucht. Es wurde unter anderem die relative Genexpression des Kollagens Typ II in frisch isolierten Chondrozyten und chondrogen differenzierten MSCs bestimmt. Die chondrogen differenzierten Massenkulturen exprimierten im Vergleich zur frisch isolierten Chondrozyten signifikant weniger Kollagen Typ II.

Dennoch zeigt diese Arbeit, dass IL-10 und TNF α einen modulatorischen Effekt auf die chondrogene Differenzierung der MSCs haben können. IL-10 und TNF α könnten eine Rolle in der Chondrogenese spielen, allerdings benötigt die Aufklärung ihrer Interaktion weiterer Studien. Weiterhin wurden die MSCs in dieser Arbeit nur mit einer Konzentration (10ng/ml) der Zytokine stimuliert. Es bleibt also unklar ob eine niedrigere oder höhere Konzentration an TNF α und/oder IL-10 in einer linearen oder gar exponentiellen Abhängigkeit zu der Expression der Knorpelmarker stehen könnten. Es wäre allerdings denkbar, dass eine veränderte Konzentration keinen signifikanten Unterschied erzielt. Was ebenfalls einen Einfluss auf die Menge und Qualität der stimulierten Zellen haben könnte ist eine Verlängerung der Chondrogenese auf zum Beispiel 21 oder mehr Tage. Das damit verbundene Risiko ist die höhere Wahrscheinlichkeit der Verunreinigung der Kulturen während der stattfindenden Stimulation der Zellkulturplatten. Ferner waren für die Isolierung, Expansion der Stammzellen und Stimulation der Kulturen mehrere Wochen notwendig. Die Isolierung der MSCs, sowie die Anfertigung der Massenkulturen gestalteten sich hingegen als einfach und für den Patienten risikoarm. In weiteren Studien sollte deswegen an einer Möglichkeit geforscht werden diese Prozesse zu verkürzen damit die Behandlung mit chondrogen differenzierten MSCs in der Zukunft eine geeignete Alternative bei der Therapie von Knorpeldefekten darstellen kann.

8. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Multipotenz der MSCs konnte nachgewiesen werden und die durchflusszytometrische Untersuchung der isolierten Zellen zeigte ein für MSCs typisches CD-Muster. Aus dem Knochenmark spongiöser Knochen können mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation MSCs isoliert werden, die dank der Fähigkeit der multiplen Differenzierung eine potentiell wichtige Rolle in der Medizin spielen können. Die MSCs sind in der Lage stabile 3D-Kulturen zu bilden. Diese Kulturen sind frei vom Trägermaterial. Dadurch können denkbare Unverträglichkeitsreaktionen durch das Biomaterial eines Trägers vermieden werden. Diese Kulturen haben während des Versuchs ihre dreidimensionale Form behalten. Es ist vorstellbar, dass so eine Struktur in der Lage ist, einen osteochondralen Defekt in einem arthrotischen Gelenk zu decken. Leider ist die Zellmenge, die für eine 3D-Kultur gebraucht wird, relativ groß, was die denkbare klinische Anwendung stark reduziert. Die chondrogen differenzierten MSCs exprimierten die typischen Marker des hyalinen Knorpels, jedoch war die Expression im Vergleich zur frisch isolierten Chondrozyten signifikant geringer. Der größte Stimulationseffekt von IL-10 erwies sich bei der Expression von Kollagen Typ II. Die Ergebnisse der relativen Genexpression waren leider nicht signifikant. Ein möglicher Faktor ist die geringe Menge an Spendern, die untersucht werden konnten. Die MSCs exprimieren nicht nur den IL-10-R sondern auch IL-10 selbst. Sowohl die in dieser Arbeit zitierte Literatur als auch die Ergebnisse zeigen, dass TNF α und wahrscheinlich auch IL-10 eine entscheidende Rolle in der Arthrose und in der chondrogenen Differenzierung der MSCs spielen. Bereits eine kurze Stimulation kann die Expression von STAT3 in den MSCs induzieren. Sowohl IL-10 als auch TNF α haben die Chondrogenese der MSCs nicht inhibiert. Eine erhöhte Expression von IL-10 unter TNF α -Stimulation indiziert eine gegenseitige Interaktion zwischen den beiden Zytokinen. Die Stimulation mit IL-10 zeigte überraschenderweise im Gegensatz zur Stimulation mit TNF α keine Wirkung auf die Expression von sox9. Alle Stimulationsversuche erfolgten mit einer Zytokinkonzentration von 10 ng/ml, was einer physiologischen Konzentration im Blut entspricht [80].

Die Aufklärung des Einflusses von IL-10 und TNF α auf die chondrogene Differenzierung der MSCs benötigt weitere Untersuchungen. Die Kenntnis des genauen Wirkungsmechanismus könnte eine wichtige Rolle für regenerative Knorpeltherapien spielen. Dabei sollte die Untersuchung größerer Spenderzahlen, der Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen der Zytokine allein und in Kombination und weitere Stimulationszeiträume bei den Stimulationsversuchen in Erwägung gezogen werden.

9. Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
AB	Alcianblau
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
APC	Allophycocyanin
CD	Cluster of differentiation
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ECM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HE	Hematoxylin-Eosin
IL-10	Interleukin-10
IL-10R	Interleukin-10-Rezeptor
Ko	Kontrolle
MACT	Matrixassoziierte autologe Chondrozytentransplantation
MSCs	Humane mesenchymale Stammzellen
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PGA	Poly glycolic acid
RT	Raumtemperaatur
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction
sox9	SOX9: SRY (sex determining region Y)-box 9,
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBS	tris buffered saline
TGF- β 1	transforming growth factor β 1
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan

10. Literaturverzeichnis

1. Soltan, M., D. Smiler, and J.H. Choi, *Bone marrow: orchestrated cells, cytokines, and growth factors for bone regeneration*. *Implant Dent*, 2009. **18**(2): p. 132-41.
2. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
3. Hernigou, P., et al., *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells*. *J Bone Joint Surg Am*, 2005. **87**(7): p. 1430-7.
4. Jackson, W.M., et al., *Mesenchymal progenitor cells derived from traumatized human muscle*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009. **3**(2): p. 129-38.
5. Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan, *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*. *J Cell Mol Med*, 2004. **8**(3): p. 301-16.
6. Sakaguchi, Y., et al., *Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(8): p. 2521-9.
7. Jager, M., et al., [*Bone harvesting from the iliac crest*]. *Orthopade*, 2005. **34**(10): p. 976-82, 984, 986-90, 992-4.
8. Caplan, A.I. and S.P. Bruder, *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. *Trends Mol Med*, 2001. **7**(6): p. 259-64.
9. Chang, Y., P.H. Hsieh, and C.C. Chao, *The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential*. *Chang Gung Med J*, 2009. **32**(3): p. 264-75.
10. Mafi, R., et al., *Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature*. *Open Orthop J*, 2011. **5 Suppl 2**: p. 242-8.
11. Martins, A.A., et al., *Quantification and immunophenotypic characterization of bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells by multicolor flow cytometry*. *Transplant Proc*, 2009. **41**(3): p. 943-6.
12. Augello, A., T.B. Kurth, and C. De Bari, *Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches*. *Eur Cell Mater*, 2010. **20**: p. 121-33.
13. Tormin, A., et al., *Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (MSC) based on gene expression profiling of functionally defined MSC subsets*. *Cytotherapy*, 2009. **11**(2): p. 114-28.
14. Beane, O.S., et al., *Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(12): p. e115963.
15. Gharaibeh, B., et al., *Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(9): p. 1501-9.
16. Huang, G.C., et al., *The development of new density gradient media for purifying human islets and islet-quality assessments*. *Transplantation*, 2004. **77**(1): p. 143-5.
17. Furukawa, T., et al., *Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee*. *J Bone Joint Surg Am*, 1980. **62**(1): p. 79-89.

18. Kumai, T., et al., *Fixation of osteochondral lesions of the talus using cortical bone pegs*. J Bone Joint Surg Br, 2002. **84**(3): p. 369-74.
19. Barry, F., et al., *Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components*. Exp Cell Res, 2001. **268**(2): p. 189-200.
20. Johnstone, B., et al., *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Exp Cell Res, 1998. **238**(1): p. 265-72.
21. Kim, M., et al., *Transient exposure to TGF-beta3 improves the functional chondrogenesis of MSC-laden hyaluronic acid hydrogels*. J Mech Behav Biomed Mater, 2012. **11**: p. 92-101.
22. Kondo, M., et al., *IL-6/STAT3 signaling pathway contributes to chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Arthritis Rheumatol, 2015.
23. Murray, P.J., *Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response*. Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(4): p. 379-86.
24. Akiyama, H., *Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9*. Mod Rheumatol, 2008. **18**(3): p. 213-9.
25. Barrios, M., et al., *Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia*. Haematologica, 2003. **88**(7): p. 801-10.
26. Kang, H.J., et al., *Autologous peripheral blood stem cell transplantation with BCVAC conditioning in childhood acute myeloid leukemia*. Bone Marrow Transplant, 2004. **33**(5): p. 471-6.
27. Ustun, C., et al., *Hematopoietic stem-cell transplantation for advanced systemic mastocytosis*. J Clin Oncol, 2014. **32**(29): p. 3264-74.
28. Chou, S.H., et al., *Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy*. Cell Transplant, 2014. **23**(4-5): p. 513-29.
29. Prasad, K., et al., *Intravenous autologous bone marrow mononuclear stem cell therapy for ischemic stroke: a multicentric, randomized trial*. Stroke, 2014. **45**(12): p. 3618-24.
30. Connick, P., et al., *Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study*. Lancet Neurol, 2012. **11**(2): p. 150-6.
31. Hernigou, P., et al., *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88 Suppl 1 Pt 2**: p. 322-7.
32. Jager, M., et al., *Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects*. J Orthop Res, 2011. **29**(2): p. 173-80.
33. Orozco, L., et al., *Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study*. Transplantation, 2013. **95**(12): p. 1535-41.
34. Wong, K.L., et al., *Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up*. Arthroscopy, 2013. **29**(12): p. 2020-8.
35. Jo, C.H., et al., *Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial*. Stem Cells, 2014. **32**(5): p. 1254-66.
36. Aggarwal, S. and M.F. Pittenger, *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1815-22.

37. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
38. Selmani, Z., et al., *Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells*. Stem Cells, 2008. **26**(1): p. 212-22.
39. Caplan, A.I. and J.E. Dennis, *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. J Cell Biochem, 2006. **98**(5): p. 1076-84.
40. Rosado, M.M., et al., *Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells*. Stem Cells Dev, 2015. **24**(1): p. 93-103.
41. Benjamin, M. and J.R. Ralphs, *Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load*. J Anat, 1998. **193 (Pt 4)**: p. 481-94.
42. Korhonen, R.K., et al., *Importance of the superficial tissue layer for the indentation stiffness of articular cartilage*. Med Eng Phys, 2002. **24**(2): p. 99-108.
43. Martinek, V., P. Ueblacker, and A.B. Imhoff, *Current concepts of gene therapy and cartilage repair*. J Bone Joint Surg Br, 2003. **85**(6): p. 782-8.
44. Woodhouse, F.G., B.S. Gardiner, and D.W. Smith, *Short-term consolidation of articular cartilage in the long-term context of osteoarthritis*. J Theor Biol, 2015. **368**: p. 102-12.
45. Schulze-Tanzil, G., *Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair*. Ann Anat, 2009. **191**(4): p. 325-38.
46. Schenker, M.L., et al., *Pathogenesis and prevention of posttraumatic osteoarthritis after intra-articular fracture*. J Am Acad Orthop Surg, 2014. **22**(1): p. 20-8.
47. Arden, N. and M.C. Nevitt, *Osteoarthritis: epidemiology*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006. **20**(1): p. 3-25.
48. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation*. Instr Course Lect, 1998. **47**: p. 487-504.
49. Haenle, M., et al., *[Economic impact of infected total hip arthroplasty in the German diagnosis-related groups system]*. Orthopade, 2012. **41**(6): p. 467-76.
50. Rivera, J.C., et al., *Posttraumatic osteoarthritis caused by battlefield injuries: the primary source of disability in warriors*. J Am Acad Orthop Surg, 2012. **20 Suppl 1**: p. S64-9.
51. Schulze, A. and H.P. Scharf, *[Satisfaction after total knee arthroplasty. Comparison of 1990-1999 with 2000-2012]*. Orthopade, 2013. **42**(10): p. 858-65.
52. Clohisy, J.C., et al., *Reasons for revision hip surgery: a retrospective review*. Clin Orthop Relat Res, 2004(429): p. 188-92.
53. Jafari, S.M., et al., *Revision hip arthroplasty: infection is the most common cause of failure*. Clin Orthop Relat Res, 2010. **468**(8): p. 2046-51.
54. van der Weegen, W., et al., *No Difference Between Intra-Articular Injection of Hyaluronic Acid and Placebo for Mild to Moderate Knee Osteoarthritis: A Randomized, Controlled, Double-Blind Trial*. J Arthroplasty, 2014.
55. Filardo, G., et al., *Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage regeneration in osteoarthritic knees: results and failures at midterm follow-up*. Am J Sports Med, 2013. **41**(1): p. 95-100.
56. Kon, E., et al., *Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment: A systematic review*. Bone Joint Res, 2013. **2**(2): p. 18-25.

57. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthritis*. Ann Rheum Dis, 1957. **16**(4): p. 494-502.
58. Guenther, D., et al., *Overweight and obesity in hip and knee arthroplasty: Evaluation of 6078 cases*. World J Orthop, 2015. **6**(1): p. 137-44.
59. Chen, H.T., et al., *Adiponectin enhances intercellular adhesion molecule-1 expression and promotes monocyte adhesion in human synovial fibroblasts*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92741.
60. Francin, P.J., et al., *Association between adiponectin and cartilage degradation in human osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2014. **22**(3): p. 519-26.
61. Gross, J.B., et al., *Synovial fluid levels of adipokines in osteoarthritis: Association with local factors of inflammation and cartilage maintenance*. Biomed Mater Eng, 2014. **24**(1 Suppl): p. 17-25.
62. Kunisch, E., et al., *Predominant activation of MAP kinases and pro-destructive/pro-inflammatory features by TNF alpha in early-passage synovial fibroblasts via TNF receptor-1: failure of p38 inhibition to suppress matrix metalloproteinase-1 in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(8): p. 1043-51.
63. Schlegel Gomez, R., P. von den Driesch, and O.P. Hornstein, *Immunohistology in Sweet's syndrome*. Br J Dermatol, 1991. **125**(4): p. 402-3.
64. Evans, H.G., et al., *TNF-alpha blockade induces IL-10 expression in human CD4+ T cells*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3199.
65. Inoue, M., et al., *T cells down-regulate macrophage TNF production by IRAK1-mediated IL-10 expression and control innate hyperinflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(14): p. 5295-300.
66. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
67. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
68. Cohen, S.L., A.M. Moore, and W.E. Ward, *Interleukin-10 knockout mouse: a model for studying bone metabolism during intestinal inflammation*. Inflamm Bowel Dis, 2004. **10**(5): p. 557-63.
69. Schulze-Tanzil, G., et al., *Interleukin-10 and articular cartilage: experimental therapeutical approaches in cartilage disorders*. Curr Gene Ther, 2009. **9**(4): p. 306-15.
70. Jung, Y.K., et al., *Role of interleukin-10 in endochondral bone formation in mice: anabolic effect via the bone morphogenetic protein/Smad pathway*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(12): p. 3153-64.
71. Helmark, I.C., et al., *Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticularly and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(4): p. R126.
72. Liu, X., et al., *Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation*. J Immunol, 2012. **189**(3): p. 1182-92.
73. Selleri, S., et al., *Cord-blood-derived mesenchymal stromal cells downmodulate CD4+ T-cell activation by inducing IL-10-producing Th1 cells*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(7): p. 1063-75.
74. Niu, J., et al., *Prevention of acute liver allograft rejection by IL-10-engineered mesenchymal stem cells*. Clin Exp Immunol, 2014. **176**(3): p. 473-84.
75. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.

76. Shirai, T., et al., *Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumour necrosis factor*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 803-6.
77. Fischer, B.A., S. Mundle, and A.A. Cole, *Tumor necrosis factor-alpha induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 236-42.
78. Ghosh, S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S81-96.
79. de Groof, F., et al., *Acute stress response in children with meningococcal sepsis: important differences in the growth hormone/insulin-like growth factor I axis between nonsurvivors and survivors*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3118-24.
80. Ojeda Ojeda, M., et al., *TNFalpha production in whole blood cultures from healthy individuals*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(2): p. 538-41.
81. Hong, S., et al., *TNF-alpha confers resistance to Fas-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis through the induction of soluble Fas*. Life Sci, 2015. **122**: p. 37-41.
82. Hess, K., et al., *TNFalpha promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway*. Bone, 2009. **45**(2): p. 367-76.
83. Colombel, J.F., et al., *Four-year maintenance treatment with adalimumab in patients with moderately to severely active ulcerative colitis: Data from ULTRA 1, 2, and 3*. Am J Gastroenterol, 2014. **109**(11): p. 1771-80.
84. Heldens, G.T., et al., *Catabolic factors and osteoarthritis-conditioned medium inhibit chondrogenesis of human mesenchymal stem cells*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(1-2): p. 45-54.
85. Phillips, M., et al., *Inhibition of 3T3-L1 adipose differentiation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 1)**: p. 395-402.
86. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.
87. Erggelet, C., et al., *Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants*. J Orthop Res, 2009. **27**(10): p. 1353-60.
88. Pillai, C.K. and C.P. Sharma, *Review paper: absorbable polymeric surgical sutures: chemistry, production, properties, biodegradability, and performance*. J Biomater Appl, 2010. **25**(4): p. 291-366.
89. Tuan, R.S., A.F. Chen, and B.A. Klatt, *Cartilage regeneration*. J Am Acad Orthop Surg, 2013. **21**(5): p. 303-11.
90. Nehrer, S., et al., *Treatment of full-thickness chondral defects with hyalograft C in the knee: a prospective clinical case series with 2 to 7 years' follow-up*. Am J Sports Med, 2009. **37 Suppl 1**: p. 81S-87S.
91. Paxton, E.W., et al., *Is There a Difference in Total Knee Arthroplasty Risk of Revision in Highly Crosslinked versus Conventional Polyethylene?* Clin Orthop Relat Res, 2015. **473**(3): p. 999-1008.
92. Te Stroet, M.A., et al., *The use of a long stem cemented femoral component in revision total hip replacement: a follow-up study of five to 16 years*. Bone Joint J, 2014. **96-B**(9): p. 1207-13.
93. Steinwachs, M.R., B. Waibl, and P. Niemeyer, *[Use of human progenitor cells in the treatment of cartilage damage]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2011. **54**(7): p. 797-802.

94. Baboolal, T.G., et al., *Intrinsic multipotential mesenchymal stromal cell activity in gelatinous Heberden's nodes in osteoarthritis at clinical presentation*. Arthritis Res Ther, 2014. **16**(3): p. R119.
95. Goodison, S., V. Urquidi, and D. Tarin, *CD44 cell adhesion molecules*. Mol Pathol, 1999. **52**(4): p. 189-96.
96. Haeryfar, S.M. and D.W. Hoskin, *Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3581-8.
97. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
98. Nielsen, J.S. and K.M. McNagny, *Novel functions of the CD34 family*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3683-92.
99. Simmons, D.L., et al., *Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells*. J Immunol, 1992. **148**(1): p. 267-71.
100. Bassi, G., et al., *Adipose-derived stromal cells (ASCs)*. Transfus Apher Sci, 2012. **47**(2): p. 193-8.
101. Ferraro, G.A., et al., *Human adipose CD34+ CD90+ stem cells and collagen scaffold constructs grafted in vivo fabricate loose connective and adipose tissues*. J Cell Biochem, 2013. **114**(5): p. 1039-49.
102. Yu, G., et al., *Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes*. Cytotherapy, 2010. **12**(4): p. 538-46.
103. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
104. Schmitz, B., et al., *Increased monocyte adhesion by endothelial expression of VCAM-1 missense variation in vitro*. Atherosclerosis, 2013. **230**(2): p. 185-90.
105. Buhring, H.J., et al., *Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1176**: p. 124-34.
106. Gong, X., et al., *Isolation and characterization of lung resident mesenchymal stem cells capable of differentiating into alveolar epithelial type II cells*. Cell Biol Int, 2012.
107. Moscoso, I., et al., *Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation*. Transplant Proc, 2005. **37**(1): p. 481-2.
108. Kang, X.Q., et al., *Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro*. Cell Biol Int, 2006. **30**(7): p. 569-75.
109. Soukup, T., et al., *Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2006. **49**(1): p. 27-33.
110. Gerter, R., J. Kruegel, and N. Miosge, *New insights into cartilage repair - the role of migratory progenitor cells in osteoarthritis*. Matrix Biol, 2012. **31**(3): p. 206-13.
111. Koelling, S., et al., *Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 324-35.
112. Kurz, B., et al., *Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury*. Ann Anat, 2005. **187**(5-6): p. 473-85.
113. Gerstenfeld, L.C., et al., *Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(9): p. 1584-92.

114. Murakami, S., V. Lefebvre, and B. de Crombrugge, *Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3687-92.
115. Liu, L.N., et al., *Comparison of drug and cell-based delivery: engineered adult mesenchymal stem cells expressing soluble tumor necrosis factor receptor II prevent arthritis in mouse and rat animal models*. Stem Cells Transl Med, 2013. **2**(5): p. 362-75.
116. van Buul, G.M., et al., *Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture*. Osteoarthritis Cartilage, 2012. **20**(10): p. 1186-96.
117. John, T., et al., *Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF-alpha in human articular chondrocytes in vitro*. Cytokine, 2007. **40**(3): p. 226-34.
118. Botha-Scheepers, S., et al., *Innate production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 is associated with radiological progression of knee osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(8): p. 1165-9.
119. Iannone, F., et al., *Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes*. Clin Exp Rheumatol, 2001. **19**(2): p. 139-45.
120. Liu, H., et al., *The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2864-71.
121. Razmkhah, M., et al., *Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF-beta1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: do they protect breast cancer cells from the immune response?* Cell Immunol, 2011. **266**(2): p. 116-22.
122. Nasef, A., et al., *Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells*. Gene Expr, 2007. **13**(4-5): p. 217-26.
123. Li, Z., et al., *Expression and secretion of interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated mesenchymal stem cells*. FEBS J, 2010. **277**(18): p. 3688-98.
124. Ouchi, T., et al., *Collaboration of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and BRCA1 in differential regulation of IFN-gamma target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5208-13.
125. Yang, C.C., et al., *Matrix metalloproteases and tissue inhibitors of metalloproteinases in medial plica and pannus-like tissue contribute to knee osteoarthritis progression*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79662.
126. Allan, D.A., *Structure and physiology of joints and their relationship to repetitive strain injuries*. Clin Orthop Relat Res, 1998(351): p. 32-8.
127. Arokoski, J.P., et al., *Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading*. Scand J Med Sci Sports, 2000. **10**(4): p. 186-98.
128. Julkunen, P., et al., *Characterization of articular cartilage by combining microscopic analysis with a fibril-reinforced finite-element model*. J Biomech, 2007. **40**(8): p. 1862-70.
129. Glenn, S.T., et al., *Maximizing RNA yield from archival renal tumors and optimizing gene expression analysis*. J Biomol Screen, 2010. **15**(1): p. 80-5.
130. Hatlapatka, T., et al., *Optimization of culture conditions for the expansion of umbilical cord-derived mesenchymal stem or stromal cell-like cells using xeno-free culture conditions*. Tissue Eng Part C Methods, 2011. **17**(4): p. 485-93.

131. Majore, I., et al., *Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord*. Stem Cell Rev, 2011. 7(1): p. 17-31.

11. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michal Wojciech Jagielski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Einfluss von Interleukin-10 und TNF α auf die chondrogene Differenzierung der humanen mesenchymalen Stammzellen

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Michał Wojciech Jagielski hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Jagielski, M., Wolf, J., Marzahn, U., Völker, A., Lemke, M., Meier, C., Ertel, W., Godkin, O., Arens, S., Schulze-Tanzil, G. The Influence of IL-10 and TNF α on Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Cultures. International Journal of Molecular Sciences, 15(9), (2014).

Beitrag im Einzelnen:

Herr Jagielski wirkte signifikant bei der Initiation der Arbeit und der o.g. Publikation mit. Dies beinhaltete die detaillierte Mitplanung des Studienkonzepts, Durchführung der Versuche und Bewertung der Ergebnisse. Die Rekrutierung der Proben aus der Klinik für Orthopädische, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Campus Benjamin Franklin wurde im Wesentlichen von Herrn Jagielski durchgeführt. Er kultivierte die isolierten MSCs und setzte alle trägermaterialfreien 3D-Kulturen an. Herr Jagielski führte sowohl die durchflusszytometrischen Analysen, RT-PCR-Analysen als auch histologische und immunhistologische Färbungen der 2D- und 3D-Kulturen und deren Auswertungen durch. Die statistischen Auswertungen wurden von Herrn Jagielski durchgeführt. Zusammen mit Frau PD Dr. med. vet. Schulze-Tanzil erstellte er das Manuskript.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

12. Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13. Publikationsliste

13.1 Publikationen

Jagielski, M., Wolf, J., Marzahn, U., Völker, A., Lemke, M., Meier, C., Ertel, W., Godkin, O., Arens, S., Schulze-Tanzil, G. (2014). The Influence of IL-10 and TNF α on Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Cultures. International Journal of Molecular Sciences, 15(9), 15821–15844. doi:10.3390/ijms150915821

13.2 Posterbeiträge

Jagielski, M., Wolf, J., Marzahn, U., Völker, A., Lemke, M., Meier, C., Ertel, W., Schulze-Tanzil, G.. The Influence of IL-10 and TNF α on Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Cultures. European Students' Conference Berlin, 21.09.2011 – 24.09.2011

14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil für die Aufnahme in Ihre Forschungsgruppe und Ermöglichung dieser Dissertation ganz herzlich bedanken. Ihre wertvollen Ideen, Anregungen und Korrekturen waren essentiell für die Entstehung dieser Arbeit. Ich bedanke mich ganz persönlich für eine hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel für die Möglichkeit, im Forschungslabor der Klinik für Orthopädische, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie promovieren zu können.

Herrn PD Dr. med. S. Arens möchte ich für die Bereitstellung der Proben für diese Dissertation und für zahlreiche Ideen danken.

Insbesondere möchte ich mich bei ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Labors für Einarbeitung in die Labortätigkeit sowie für die vielen guten Ratschläge bedanken.

Am meisten möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken. Ich danke meiner Ehefrau, Dagny für eine kräftige Unterstützung und Hilfe während der Entstehung dieser Arbeit, sowie bei meiner neugeborenen Tochter Magdalena für den entscheidenden Schub Motivation. Ich bedanke mich bei meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem Bruder für die seelische Unterstützung bei Fertigstellung dieser Dissertation.