

**Aus der Klinik für Pferde Allgemeine Chirurgie und Radiologie des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

Titel der Arbeit:

Synoviale Stammzellen als alternative Zellquelle für das Knorpel Tissue Engineering

**Das Zusammenspiel von BMP2 und TGF- β in der chondrogenen Differenzierung
synovialer Stammzellen und der Einfluss von Dexamethason**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Nikolas Johannes Kovermann

Tierarzt

aus Köln

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4285

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christoph Lischer
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Leo Brunnberg

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): cartilage, chondrocytes, stem cells, synovial fluid, dexamethasone, bones, tissue repair, surgical operations

Tag der Promotion: 08.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Klinischer Hintergrund	8
1.2 Literatur.....	8
1.2.1 Aufbau des hyalinen Knorpels	8
1.2.2 Aktuelle Therapieoptionen bei Knorpelläsionen	10
1.2.3 Neue Ansätze zur Regeneration des Knorpels.....	11
1.2.3.1 Tissue Engineering	11
1.2.3.2 Knorpel Tissue Engineering.....	12
1.2.3.3 Synoviale Stammzellen	14
1.2.3.4 Transforming growth factor- β	16
1.2.3.5 Bone morphogenetic protein 2.....	18
1.2.3.6 Dexamethason	20
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Grundkonzept des Projektes	23
2.2 Isolierung synovialer Stammzellen	23
2.3 Chondrogene Differenzierung	25
2.4 Analysen	28
2.4.1 Quantitative Polymerasekettenreaktions (PCR)-Analyse in Echtzeit	28
2.4.2 Histologische Färbungsanalyse	29
2.4.3 Makroskopische Bewertung	29
2.4.4 Safranin-O / Fast Green-Färbung	30
2.4.5 Von Kossa-Färbung	30
2.4.6 Immunhistochemie.....	30
2.4.7 Immunfluoreszenz.....	31
2.4.8 Glycosaminoglycan (GAG) / DNA-Messung.....	31
2.5 Statistische Analyse	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	32
3.1.1 Einfluss von TGF- β 1 und BMP2 auf die chondrogenen Differenzierungs- marker Aggrekan und Kollagen 2.....	32

3.1.2	SOX9/RUNX2-Verhältnis als Maß für das chondrogene Potential humaner synovialer Stammzellen in vitro.....	34
3.1.3	Einfluss von TGF- β auf die Kollagen 10-Genexpression.....	36
3.1.4	Einfluss von Dexamethason auf die Genexpression von MMP13 und von BMP2 auf die Genexpression von Kollagen 1	38
3.1.5	Einfluss von Dexamethason auf die Genexpression von Osterix in Kombination mit dem Wachstumsfaktor TGF- β	40
3.1.6	Regulation des Gens PPRy durch TGF- β	42
3.2	Biochemische Analyse	43
3.2.1	Einfluss von TGF- β und BMP2 auf den zellulären Glykosaminoglykangehalt	43
3.2.2	Einfluss von Dexamethason auf den DNA-Gehalt.....	44
3.2.3	Einfluss von Dexamethason auf das Verhältnis von Glykosaminoglykan und DNA-Gehalt	45
3.2.4	Einfluss der Kombination von BMP2 und TGF- β auf die Synthese von Glykosaminoglykanen.....	47
3.3	Histologische Analyse	48
3.3.1	Makroskopische Analyse	48
3.3.2	Safranin-O-Färbung	51
3.3.3	Von-Kossa-Färbung.....	52
3.3.4	Immunfluoreszenz.....	53
4	Diskussion.....	55
	Zusammenfassung.....	62
	Summary.....	63
	Literaturverzeichnis	64
	Danksagung.....	84
	Finanzierungsquellen.....	85
	Selbstständigkeitserklärung.....	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Zellwachstum der synovialen Stammzellen im serumhaltigen chondrogenen Wachstumsmedium (Tag 1, 2, 3 und 6).	24
Abbildung 2:	Zusammensetzung der einzelnen Medien ohne Dexamethason	26
Abbildung 3:	Zusammensetzung der einzelnen Medien mit Dexamethason	27
Abbildung 4:	Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion der chondrogenen Marker Aggrekan und Kollagen 2 ohne und mit Zugabe von Dexamethason.....	33
Abbildung 5:	Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP-2 auf die mRNA Produktion der Marker SOX9 und RUNX2 ohne und mit Zugabe von Dexamethason.....	34
Abbildung 6:	Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion von COL2/10 ohne und mit Zugabe von Dexamethason.	37
Abbildung 7:	Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion von MMP13 und Col1 ohne und mit Zugabe von Dexamethason.....	39
Abbildung 8:	Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion von Osterix ohne und mit Zugabe von Dexamethason.	41
Abbildung 9:	Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion von PPRy ohne und mit Zugabe von Dexamethason.	42
Abbildung 10:	Einfluss von TGF- β auf den zellulären Glykosaminoglykan-Gehalt.	44
Abbildung 11:	Einfluss von Dexamethason auf den DNA-Gehalt.	45
Abbildung 12:	Einfluss von Dexamethason auf das Verhältnis GAG/DNA.	46
Abbildung 13:	Einfluss von Dexamethason auf den Gehalt an Gesamt-GAG.	48
Abbildung 14:	Makroskopische Analyse der Größe der Zellpellets nach 21 Tagen unter Dexamethason, TGF- β und BMP2 (alleine und in Kombination).	50
Abbildung 15:	Safranin-O-Fast-Green-Färbung zur Detektion von Proteoglykanen auf synovialen Stammzellen unter dem Einfluss von Dexamethason und TGF- β und BMP2 (Maßstab schwarz für 10x Objektiv=200 μ m, Maßstab für 40x Objektiv= 1000 μ m).	52
Abbildung 16:	Von-Kossa-Färbung zur Ermittlung der Mineralisation und Kalzifizierung der synovialen Stammzellen unter Dexamethason und TGF- β und BMP2 (Maßstab schwarz für 10x Objektiv=200 μ m, Maßstab 40x Objektiv= 1000 μ m).	53

Abbildung 17: Immunfluoreszenz zur Ermittlung der Kollagen-2- / DAPI-Reaktion auf synoviale Stammzellen unter Dexamethason und BMP2 und TGF- β) Maßstab schwarz für 10x Objektiv=200 μ m, Maßstab für 40x Objektiv=1000 μ m).....54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Gensequenzen der untersuchten Marker.....29

Tabelle 2: Primers on demand.....29

Abkürzungsverzeichnis

Agg:	Aggrekan
BMP2:	Bone morphogenetic protein 2
BMSCs:	Bone marrow derived stem cells
Col1:	Kollagen 1
Col10:	Kollagen 10
Col2:	Kollagen 2
Dex:	Dexamethason
dH ₂ O	distilled water
DMEM:	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA:	Deoxyribonucleic acid
EZM:	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetal Bovine Serum
GAG:	Glycosaminoglykan
IF:	Immunfluoreszenz
MMP13:	Matrix Metalloproteinase 13
MSCs:	Mesenchymal stem cells
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PPRy:	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
qPCR:	quantitative real-time PCR
RNA:	Ribonucleic acid
RT	Real Time
RUNX2:	RUNX family transcription factor 2
SDSCs:	Synovium derived stem cells
SMAD	Mothers against decapentaplegic
SOX9:	SRY-box transcription factor 9
Sp7:	Osterix
TGF:	Transforming growth factor
Total GAG:	Totales Glycosaminoglykan

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Weltweit stellen traumatische und degenerative Gelenkerkrankungen, die den hyalinen Knorpel schädigen, bis heute ein relevantes Gesundheitsproblem dar. Trotz vielversprechender Behandlungsansätze im Bereich der Knorpelregeneration ist es aktuell noch nicht möglich, den hyalinen Gelenkknorpel zu regenerieren.

Aufgrund der immer höheren Lebenserwartung des Menschen mit dem Bestreben, bis in hohe Lebensalter unabhängig und mobil zu sein, stellt sich die Herausforderung für die Medizin, beeinträchtigende Gelenkerkrankungen gut therapieren zu können.

Dafür werden neben der ständigen Weiterentwicklung konservativer und chirurgischer Therapien neue Ansätze zur Regeneration des Knorpels gesucht.

Eine Möglichkeit zur Bewältigung der Herausforderung, chondrale Läsionen zu behandeln, könnten zellbasierte regenerative Therapien sein.

1.2 Literatur

1.2.1 Aufbau des hyalinen Knorpels

Der Gelenkknorpel ist ein hoch spezialisiertes Gewebe von diarthrodialen Gelenken.

Die Funktion des Knorpels besteht darin, eine glatte und geschmeidige Oberfläche für die Gelenkverbindungen zu bilden, um somit eine mechanische Belastung möglich zu machen und als Stoßdämpfer zu fungieren (Fox et al. 2009; Bhosale & Richardson 2008).

Knorpelgewebe ist ein avaskuläres, aneurales, alymphatisches Gewebe mit geringem zellulärem Anteil und besitzt eine geringe Reparations- und Regenerationskapazität. Die Fachliteratur geht davon aus, dass diese begrenzte Regenerationskapazität des hyalinen Gelenkknorpels zum einen auf der Tatsache der avaskulären Umgebung und zum anderen auf der begrenzten Anzahl von Chondrozyten beruht (Convery et al. 1972).

Drei verschiedene Typen von Knorpelgewebe werden unterschieden: hyaliner, elastischer und Faserknorpel (Fox et al. 2009; Lüllmann-Rauch 2009).

Der Gelenkknorpel besteht aus Knorpelzellen, sogenannten Chondrozyten, und der extrazellulären Matrix (EZM). Die extrazelluläre Matrix bildet ein Gerüst aus stützenden Kollagenfibrillen und Wasser bindenden Proteoglykanen. Die wenigen Chondrozyten, in deren

geringem Anteil von etwa 1-3% des Knorpelgesamtvolumens sich der zellarme Charakter des hyalinen Knorpels ausdrückt, werden von dieser extrazellulären Matrix eingebettet.

Die EZM besteht überwiegend aus Proteoglykanen, Kollagenfibrillen und Wasser. Proteoglykane wie Aggrecan bilden mit Hyaluron große Proteoglykankomplexe und sind mit den Kollagenfibrillen, vor allem vom Typ 2,9 und 11, vernetzt.

Diese Proteoglykankomplexe können aufgrund ihrer vielen polaren und sauren Gruppen eine große Menge Wasser binden. Dadurch sind diese Komplexe zum größten Teil verantwortlich für die Fähigkeit des Knorpelgewebes, auf Beanspruchung druckelastisch zu reagieren und nach Beanspruchung in die ursprüngliche Form zurückzukehren.

Der Gelenkknorpel wird in verschiedene Zonen unterteilt (Graceffa et al. 2019; Lüllmann-Rauch 2009; Johnstone et al. 2013): die oberflächliche oder Tangentialzone, die Übergangszone, die Radiärzone und die mineralisierte Zone, die mit dem subchondralen Knochen verzahnt ist (Graceffa et al. 2019; Fox et al. 2009).

In der Oberflächzone verlaufen die Kollagenfibrillen parallel bzw. tangential zur Oberfläche, ebenso wie die spindelförmigen Chondrozyten, die sich tangential zur Oberfläche anordnen. Diese Zone ist die kleinste und macht nur ca. 10% des Knorpels aus. Allerdings ist in dieser Zone die Wasserkonzentration am höchsten.

In der Übergangszone, die mit über 50% den größten Anteil des Knorpels bildet, beginnen die Kollagenfibrillen sich radiär auszurichten, sind aber größtenteils zufällig angeordnet. Der Durchmesser der Kollagenfibrillen ist in der Übergangszone im Vergleich zu den anderen Zonen am größten. Die Chondrozyten stellen sich in dieser Schicht oval bis rundlich dar und sind in Säulen senkrecht zur Oberfläche angeordnet. In dieser Zone ist die Konzentration an Glykosaminen am höchsten. Ihr Wassergehalt gering.

In der Radiär- oder Tiefenzone verlaufen die Kollagenfasern senkrecht und strahlen in die sogenannte Tidemark, eine Grenze zwischen der kalzifizierten und nicht kalzifizierten Umgebung, ein. Diese kann unter dem Lichtmikroskop als eine basophile Linie gesehen werden. Die Radiär- oder Tiefenzone ist mit circa 30% der Knorpeldicke die zweitgrößte Zone des Knorpels. Die Chondrozyten, welche von Kollagenfasern umhüllt werden, sind von rundlicher Gestalt und säulenartig angeordnet.

Die dünne mineralisierte Zone trennt den hyalinen Knorpel vom subchondralen Knochen. Die Chondrozyten können als kleine runde Zellen charakterisiert werden. Die Kollagenfibrillen, die senkrecht in die Tidemark einstrahlen, verleihen dieser Zone Stabilität.

1.2.2 Aktuelle Therapieoptionen bei Knorpelläsionen

Die Behandlung von degenerativen Gelenkerkrankungen kann bis zum heutigen Zeitpunkt auf vielfältige Weise erfolgen. Die multimodale Schmerztherapie bei chronischen Gelenkerkrankungen, wie unter anderem der Arthrose, ist ein vielversprechender Ansatz (Kaiser et al. 2015; Casser et al. 2013). Um eine medikamentöse Schmerzlinderung zu erreichen, werden entzündungshemmende Medikamente wie nichtsteroidale Antirheumatika NSAID und Glukokortikoide (Caporali et al. 2013; Bijlsma et al. 2015) eingesetzt.

Nichtmedikamentöse Maßnahmen können unter anderem physikalische Rehabilitation, Gewichtskontrolle und Bewegung sein. Eicosapentaensäure (EPA)-reiche Diät und Chondroprotektiva können therapieunterstützend wirken.

Mit den erwähnten Maßnahmen der multimodalen Schmerztherapie lässt sich in den meisten Fällen allerdings nur eine Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung und eine Minderung der Schmerzen erreichen.

Parallel zur konservativen Schmerztherapie können operative Eingriffe notwendig werden, um Schmerzfreiheit zu erzielen.

Nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGOU) werden in Abhängigkeit von Defektgröße und Lokalisation des Knorpels verschiedene Methoden zur chirurgischen Therapie empfohlen (Niemeyer et al. 2013).

Zu diesen Behandlungsverfahren der Rekonstruktion isolierter Knorpelschäden gehören die autologe Chondrozytentransplantation (ACT), die osteochondrale Transplantation (OCT) und die knochenmarkstimulierenden Verfahren (BMS) (Niemeyer et al. 2013).

Eine der möglichen chirurgischen Behandlungsmethoden für fokale chondrale Läsionen ist die erwähnte ACT (Peterson et al. 2010; Imhoff 2000; Erggelet 2000; Brittberg et al. 2003; Brittberg 2008; Ossendorf et al. 2011). Bei der ACT wird aus einem unbelasteten Gelenkabschnitt gesundes Knorpelgewebe des Patienten entnommen. Die entnommenen Chondrozyten werden in vitro kultiviert und in einem zweiten operativen Eingriff dem Patienten transplantiert (Niemeyer et al. 2013). Seit 1987 hat sich diese autologe Zellimplantation, die unter anderem durch die Orthopäden Lars Peterson und Mats Brittberg entdeckt und entwickelt wurde, zu einer vielversprechenden Methode etabliert, die mit sehr guten klinischen Ergebnissen überzeugen kann.

Allerdings zeigt diese Methode auch Nachteile hinsichtlich der Regeneration von Knorpel.

Der Nachteil dieser Behandlungsmethode besteht unter anderem in einer limitierten Verfügbarkeit von gesundem Knorpel, der geringen Expansionseigenschaft der gewonnenen Chondrozyten und der verminderten Knorpelqualität als Implantat, welches nur eine schlechte Integration in das umgebende Knorpelgewebe zeigt.

Darüber hinaus sind die beiden für die ACT notwendigen chirurgischen Eingriffe mit den verbundenen Entnahmedefekten als ein nachteiliger Aspekt zu erwähnen, der durch optimalere Methoden eventuell verbessert werden könnte.

Zudem kann es bei In-vitro-Kultur, insbesondere in der Monolayerexpansion, zu einer unerwünschten Dedifferenzierung der Zellen kommen.

Die Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden ist daher von großem Interesse.

Die Verwendung mesenchymaler Stammzellen für das zellbasierte Tissue Engineering ist eine vielversprechende Möglichkeit und gewinnt als potentielle Behandlungsoption, chondrale Läsionen rückgängig zu machen, zunehmend an Aufmerksamkeit (To et al. 2019).

Ziel ist es, in der regenerativen Medizin eine Methode zu finden, die eine stabile und reproduzierbare chondrogene Differenzierung von Stammzellen ermöglicht (Dimmeler et al. 2014).

1.2.3 Neue Ansätze zur Regeneration des Knorpels

1.2.3.1 Tissue Engineering

Das zellbasierte „Tissue Engineering“ wurde von Langer und Vacanti im Jahre 1993 als „ein interdisziplinäres Feld, das die Prinzipien des Ingenieurwesens und der Lebenswissenschaften auf die Entwicklung biologischer Substitute anwendet, die die Gewebefunktion wiederherstellen, erhalten oder verbessern“ beschrieben (Langer & Vacanti 1993).

Tissue Engineering basiert auf der Kombination von verschiedenen Zellen, Biofaktoren und Biomaterialien (Vinatier & Guicheux 2016). Diese Kombination wird in der Literatur als Tissue Engineering Triade bezeichnet.

Mit Hilfe der genannten drei Grundelemente der Triade und deren Kombination wird in wissenschaftlichen Ansätzen versucht, ein bestmögliches Ergebnis für die anatomische Rekonstruktion von zerstörtem Gewebe zu finden.

1.2.3.2 Knorpel Tissue Engineering

Das Knorpel Tissue Engineering soll Konzepte für Knorpelersatzgewebe entwickeln, mit deren Hilfe geschädigter Knorpel in seiner ursprünglichen Funktion und Beschaffenheit wiederhergestellt werden kann.

Für das Knorpel Tissue Engineering können verschiedene Zellen unterschiedlicher Herkunft verwendet werden.

„Die Wahl der am besten geeigneten Zellpopulation für die Regeneration von geschädigtem oder erkranktem Knorpel hängt von der Wirksamkeit der Kulturbedingungen (z. B. Medienzusätze, dreidimensionale Gerüste, mechanische Stimulation, Sauerstoffspannung, Co-Kultursysteme) ab, um einen stabilen chondrogenen Phänotyp zu induzieren“ (Graceffa et al. 2019).

Wissenschaftliche Studien, die diese Kulturbedingungen untersuchen, beschäftigen sich unter anderem mit der Verwendung von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren (Johnstone et al. 2013; Graceffa et al. 2019), den Umgebungseigenschaften, in denen die Zellen sich differenzieren, (Johnstone et al. 2013; Pattappa et al. 2019a; Pattappa et al. 2019b; Han et al. 2019) und den verwendeten Biomaterialien (Zippel et al. 2010; Johnstone et al. 2013).

Dies entspricht den klassischen drei übergeordneten Feldern des Knorpel Tissue Engineerings (Langer & Vacanti 1993; Vinatier & Guicheux 2016).

Das Ziel besteht darin, einen stabilen chondrogenen Phänotyp zu induzieren.

Um dieses Ziel zu erreichen, können bereits fertig ausdifferenzierte Knorpelzellen benutzt werden, wie dies bei der zellbasierten ACT der Fall ist.

Chondrozyten besitzen jedoch eine geringe Isolationseffizienz, ein begrenztes Proliferationspotential und die Tendenz, schnell einen phänotypischen Drift in der Kultur zu zeigen und zu dedifferenzieren. Darüber hinaus ist zur Gewinnung der Chondrozyten für die ACT ein zusätzlicher chirurgischer Eingriff am Knie erforderlich.

Für das Konzept des Knorpel Tissue Engineerings können neben der Verwendung von Chondrozyten auch mesenchymale Stammzellen (MSCs) als alternative Zellquelle genutzt werden.

Im Jahre 1976 wurden mesenchymale Stammzellen erstmals von Friedenstein aus dem menschlichen Knochenmark identifiziert (Friedenstein 1976; Bianco et al. 2008). Mesenchymale Stammzellen sind nicht hämatopoetische Zellen, die aus unterschiedlichen Herkunftsorten gewonnen werden können (Ullah et al. 2015; Beane & Darling 2012).

Aufgrund der Tatsache, dass es keine klar definierten Marker für humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) gibt, beschreibt die International Society for Cellular Therapy (ISCT) im Jahr 2006 minimale Kriterien, um multipotente stromale Stammzellen zu definieren. (Dominici et al. 2006)

So sollen sich mesenchymale Stammzellen unter anderem dadurch auszeichnen, dass sie sich in eine chondrogene, osteogene und adipogene Richtung differenzieren können.

Der Vorteil der Verwendung von mesenchymalen Stammzellen für das Knorpel Tissue Engineerings besteht darin, dass sie leicht zu isolieren sind, dass sie ein hohes Proliferationspotential besitzen und dass sie ein großes chondrogenes Differenzierungspotential aufweisen.

Die Stammzelltherapie hat in den letzten Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen, wie sich in wissenschaftlichen Publikationen zu verschiedenen Stammzellquellen, die für die chondrogene Differenzierung genutzt werden können, zeigt (Gardner et al. 2015; Gardner et al. 2013; Johnstone et al. 2013; Johnstone et al. 1998; Kovermann et al. 2019).

Zahlreiche wissenschaftliche Publikationen beschreiben das Potential mesenchymaler Stammzellen, sich chondrogen zu differenzieren (Kubosch et al. 2017; Kubosch et al. 2016; Kubosch et al. 2018; Johnstone et al. 1998; Zhou et al. 2016; Shintani et al. 2013; Johnstone et al. 2013).

So können mesenchymale Stammzellen aus verschiedenen Geweben wie Knochenmark (Mackay et al. 1998; Johnstone et al. 1998), Fettgewebe (Basoli et al. 2017; Mehlhorn et al. 2007), Zahnpulpa (Maioli et al. 2016), Plazenta (In't Anker et al. 2004) und der Synovialmembran (Kubosch et al. 2017; Kubosch et al. 2018) isoliert werden.

Allerdings zeigen mesenchymale Stammzellen die Tendenz, einen hypertrophen Phänotyp anzunehmen, wenn sie chondrogenen Stimuli ausgesetzt worden sind (Mueller & Tuan 2008; Mueller et al. 2010; Johnstone et al. 2013).

Die hypertrophe Differenzierung mesenchymaler Stammzellen kann auf molekularer Ebene mit Hilfe von Markern wie dem Kollagen 10 und RUNX2 bestimmt werden (van der Kraan & van den Berg 2012; He et al. 2014; Mueller et al. 2010; Loebel et al. 2015).

Das Problem von mesenchymalen Stammzellen, keinen stabilen Phänotyp des hyalinen Knorpels zu bilden, konnte trotz vieler Studien und Experimente noch nicht zufriedenstellend gelöst werden (Armiento et al. 2018; Li & Dong 2016; Mueller & Tuan 2008).

1.2.3.3 Synoviale Stammzellen

Die Synovialmembran bedeckt als mesenchymales Gewebe die Gelenkhöhle diarthrodialer Gelenke. Sie besteht aus zwei Schichten (Li et al. 2019; Kubosch et al. 2018): der äußeren Schicht, auch Subintima genannt, und der inneren Schicht, der sogenannten Intima.

In der äußeren Subintima befinden sich zwei bis drei Zellschichten von Synoviozyten. Diese sind in ein lockeres Bindegewebe, welches aus Fibroblasten, Kollagen und anderen extrazellulären Proteinen besteht, eingebettet (Li et al. 2019; Kubosch et al. 2018).

Die darunter liegende Intima wird aus einer dünnen Schicht aus ein bis zwei Zelllagen gebildet.

Die in der Intima befindlichen Zellen können in zwei Typen, die makrophagenähnlichen Synoviozyten (Typ A) und die fibroblastenähnlichen Synoviozyten (Typ B), unterteilt werden. Dabei übernehmen die Synoviozyten des Typs A die Aufgabe, als Fresszellen eingedrungene Pathogene zu phagozytieren. Sie sind somit wichtiger Bestandteil der angeborenen und erworbenen Immunantwort.

Die Synoviozyten Typ B produzieren Hyaluron und andere Proteinkomplexe wie Mucine für die Synovialflüssigkeit. Hyaluron macht die Synovialflüssigkeit aufgrund seiner hohen Wasserbindungsfähigkeit geschmeidig und schmiert die Gelenkoberfläche des entsprechenden Gelenkes. Diese Zellen sind durch ein prominentes endoplasmatisches Retikulum als Zellorganell charakterisiert.

Synoviozyten Typ B halten somit die Produktion und Struktur der Synovialflüssigkeit aufrecht.

Diese Zellen werden auch als Ursprung für die synovialen mesenchymalen Stammzellen definiert (Li et al. 2019; Kubosch et al. 2018).

Synoviale Stammzellen stellen eine interessante Zellquelle für das Knorpel Tissue Engineering dar, da sie eine Vielzahl von Eigenschaften aufweisen, die für die Generierung von Knorpelgewebe wichtig sind.

Mesenchymale Stammzellen aus der Synovialmembran entwickeln sich aus dem gleichen Zellpool von Vorläuferzellen wie die artikulären Chondrozyten.

De Bari et al. isolierten im Jahr 2001 erstmals mesenchymale Stammzellen aus der Synovialmembran (Bari et al. 2001; Li et al. 2019).

Sie konnten darlegen, dass synoviale Zellen von Spendern unterschiedlichen Alters in vitro über mehrere Passagen ihr Proliferationspotential behalten (Bari et al. 2001; Li et al. 2019).

Diese Eigenschaft synovialer Stammzellen konnten weitere wissenschaftliche Studien bestätigen (Sakaguchi et al. 2005; Li et al. 2019).

Neben dieser Eigenschaft, eine beständige Plastizität und ein gutes chondrogenes Potential aufzuweisen, besitzen synoviale Stammzellen die Eigenschaft, in vitro immunsuppressiv zu wirken, indem sie die Aktivierung und Vermehrung von T-Zellen unterdrücken (Djouad et al. 2005; Jones et al. 2007; Kubosch et al. 2018; Li et al. 2019; Le Blanc und Ringdén 2007). Diese Hemmung der T-Zellen scheint sich mit zunehmender Anzahl von synovialen mesenchymalen Stammzellen zu verstärken (Li et al. 2019).

Aufgrund dieser Eigenschaft weisen sich synoviale Stammzellen als klinisch interessante Zellquelle für das Knorpel Tissue Engineering aus, da sie durch diese immunologische Fähigkeit für die allogene Transplantation geeignet sein könnten (Le Blanc und Ringdén 2007; Barry et al. 2005; Kubosch et al. 2018).

Es gibt Hinweise darauf, dass synovial abgeleitete Zellen beim Menschen eine überlegene Chondrogenität in vitro gegenüber mesenchymalen Stammzellen anderen Ursprungs aufweisen können (To et al. 2019; Pei et al. 2008; Gale et al. 2019a).

Aktuelle Studien zeigen, dass sowohl humane als auch animale Stammzellen synovialer Herkunft ein höheres chondrogenes Potential im Vergleich zu anderen MSCs aufweisen (Santos et al. 2018; Gale et al. 2019a; Gale et al. 2019b; Chen et al. 2016; To et al. 2019; Kubosch et al. 2017; Kubosch et al. 2018).

Darüber hinaus werden sie auch aufgrund ihrer einfachen Isolierung, der schnellen Vermehrung in vitro und der natürlichen Lokalisation innerhalb des Kniegelenkes (Sakaguchi et al. 2005) als alternative Zellquelle für die Knorpelreparatur angesehen (Kubosch et al. 2016; Kubosch et al. 2017; Kubosch et al. 2018; Kovermann et al. 2019).

SDSCs (synovial derived stem cells) haben aufgrund ihrer anatomischen Nähe zu nativem Knorpel ein großes Potential für das Knorpel Tissue Engineering (Kubosch et al. 2018).

Diese Zellquelle weist interessante Eigenschaften auf, die für eine erfolgreiche Knorpelregeneration entscheidend sind.

Sie haben eine geringere Tendenz als andere mesenchymale Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs, hypertroph zu differenzieren (Mueller & Tuan 2008).

Wissenschaftliche Studien können darlegen, dass SDSCs, verglichen mit den BMSCs, weniger Kollagen 10 und 1 und mehr Kollagen 2 und Aggrecan auf molekularer Ebene nach chondrogener Differenzierung in vitro aufweisen (Kubosch et al. 2018).

Das starke chondrogene Differenzierungspotential in Form von Zellpellets kann durch die Anwendung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren im Differenzierungsmedium gefördert werden.

Bei den verwendeten Wachstumsfaktoren handelt es sich um TGF- β 1, TGF- β 3 und BMP2 alleine oder in Kombination (Mehlhorn et al. 2007; Shintani et al. 2013; Shintani & Hunziker 2011; Han et al. 2019).

Synoviale Stammzellen bieten demnach ein gutes Potential als alternative Zellquelle für das Knorpel Tissue Engineering.

1.2.3.4 Transforming growth factor- β

TGF- β , der transforming growth factor- β , ist ein Polypeptid, das zur transforming growth factor-Familie gehört. Es wurde von Michael B. Sporn und Anzano in den 1980er Jahren bei Untersuchungen zur Unterscheidung von physiologischen und tumorösen Zellen entdeckt (Moses et al. 2016; Sporn 2006; Sporn und Todaro 1980).

Der Wissenschaftler Robert Holley stellte eine Hypothese auf, nach der bösartige Zellen weniger von sogenannten exogenen Wachstumsfaktoren als normale Zellen benötigen (Holley 1975).

Diese Hypothese entstand, als erkannt wurde, dass das Wachstum von Zellen durch hormonähnliche Wachstumsfaktoren gesteuert wird. In diesem Zusammenhang wurde auch die erste Formulierung der autokrinen Sekretion von Wachstumsfaktoren definiert. Es konnte gezeigt werden, dass maligne transformierte Zellen die benötigten Wachstumsfaktoren selbst produzieren (Roberts et al. 1981; Sporn & Todaro 1980).

Mit dem Ziel, diese Wachstumsfaktoren zu erforschen und ihre Eigenschaften zu untersuchen, gelang es den Wissenschaftlern De Larco und Todaro im Jahre 1978, den sarcoma growth factor (SGF) zu identifizieren.

Dieser Faktor wird von viral transformierten Zellen produziert und verursacht eine phänotypische Veränderung von Zellen, die als maligne Transformation bezeichnet wird. Diese Eigenschaft des SGF, Zellen in ihrer phänotypischen Eigenschaft zu verändern, untersuchten die Forscher mit Hilfe eines Weichagar-Assays.

Auf diesem Agar können die transformierten Zellen im Gegensatz zu normalen Zelllinien wachsen (Todaro et al. 1981).

Roberts et al. konnten nach weiterer Forschung zeigen, dass dieser SGF aus zwei Fraktionen besteht, die als TGF- α und - β bezeichnet worden sind (Roberts et al. 1981).

Seit jenen Entdeckungen in den 1970/80er Jahren ist sehr viel Forschung hinsichtlich des Wachstumsfaktors TGF- β betrieben worden. Ausgehend von der ersten Annahme, dass TGF- β normale Zellen bösartig entarten lassen könnte, ist später erkannt worden, dass dieser Faktor in sehr viele Prozessen involviert und wichtig für zahlreiche physiologische Lebensprozesse ist. Dazu gehören Reaktionen wie die Entwicklung, Proliferation und Differenzierung von Zellen (Jiang et al. 2018; Massagué und Xi 2012; Wang et al. 2012; Oshimori und Fuchs 2012; Huang und Huang 2005). Darüber hinaus ist TGF- β ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz gegenüber Antigenen sowie für die Kontrolle zahlreicher Immunantworten (Kehrl et al. 1986b; Kehrl et al. 1986a; Coffman et al. 2009; Tsunawaki et al. 1988; Sanjabi et al. 2017).

Nach Sporn et. al sollte TGF- β in der Welt der Zellphysiologie nicht als ein „Ding“ betrachtet werden, sondern als Element einer komplexen biologischen Signalsprache, die sowohl für die interzelluläre als auch intrazelluläre Kommunikation verwendet wird (Sporn 2006; Sporn et al. 1990).

Die Funktion von TGF- β muss immer im Zusammenhang mit den entsprechenden biologischen Signalwegen betrachtet werden.

Um die Funktion und den möglichen Nutzen von TGF- β im Zusammenhang des Knorpel Tissue Engineerings zu verstehen, sind sowohl in vivo- als auch in vitro-Studien durchgeführt worden. Bei den in vivo-Studien wurde unter anderem TGF- β direkt in das Kniegelenk von Versuchstieren injiziert.

Es wurde auch der Einfluss einer wiederholten TGF- β -Injektion auf die Knorpel und Bandstrukturen in vivo untersucht und dabei die Beteiligung von TGF- β an der Arthrosepathologie bewertet (van Beuningen et al. 2000). In einer weiteren Studie wurde TGF- β in das Kniegelenk von Mäusen injiziert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Proteoglykansynthese der artikulären Chondrozyten stimuliert und eine Osteophytenbildung induziert wurde (van Beuningen et al. 1994).

Um in einer in vitro-Kultur mesenchymale Stammzellen chondrogen differenzieren zu können, werden den Differenzierungsmedien Wachstumsfaktoren hinzugefügt.

Diese Wachstumsfaktoren gehören häufig zu der TGF-Superfamilie. Sie stellen physiologische Regulatoren der chondrogenen Differenzierung dar. Daneben sind sie für die

in vitro-Zellproliferation und Synthese von extrazellulären Matrix-Proteinen verantwortlich und können diese stimulieren.

Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zu den Differenzierungsmedien soll eine Steigerung der Synthese einer hyalinähnlichen Matrix stimuliert werden.

Die exogene Zugabe von TGF- β kann in Chondrozytenkulturen die Proliferation und die Synthese für extrazelluläre Matrix-Proteine wie Kollagen 2 steigern.

Diese Eigenschaft konnte in zahlreichen wissenschaftlichen Studien bestätigt werden (Johnstone et al. 2013; Graceffa et al. 2019; Wang et al. 2014b; Johnstone et al. 1998; Kovermann et al. 2019; Shintani et al. 2013; Li et al. 2010; Xia et al. 2017b; Kubosch et al. 2017).

Die in den Studien verwendete Konzentration des Wachstumsfaktors TGF- β beträgt standardmäßig 10ng/ml.

Weitere Studien konnten belegen, dass TGF- β auch endogen durch mechanische Stimulation oder durch eine in vitro-Co-Kultur bei Verwendung von synovialen mesenchymalen Stammzellen mit Chondrozyten freigesetzt wird (Kubosch et al. 2016; Li et al. 2010; Gardner et al. 2017a; Fahy et al. 2018).

Diese in vitro-Co-Kultivierung führt neben der Sekretion von TGF- β zu einer Selbstorganisation und chondrogenen Differenzierung (Kubosch et al. 2016).

1.2.3.5 Bone morphogenetic protein 2

Bone morphogenetic protein 2, BMP2, ist ein Protein, welches zur TGF- β -Superfamilie gehört (Wang et al. 2014). Es wurde 1965 von Marshall Urist entdeckt und als osteoinduktiv beschrieben, nachdem demineralisierte Knochenmatrix in Muskeln von Vertebraten injiziert wurde (Grgurevic et al. 2017; Urist 1965). Die Proteingruppe wurde 1971 erstmals als Bone morphogenetic protein bezeichnet (Urist & Strates 1971).

Neben BMP2 wurden mindestens 15 weitere verschiedene BMPs identifiziert (Kang et al. 2004; Deng et al. 2018).

Neben der wichtigen Rolle der BMPs, die Knochen- und Knorpelbildung anzuregen, spielen sie in allen Organsystemen eine wichtige Rolle. In der Embryonalentwicklung sind sie an der Skelettentwicklung und der Differenzierung hämatopoetischer Zellen beteiligt (Salazar et al. 2016; Di Chen et al. 2004; Rosen 2009; Wu et al. 2016; Kishigami und Mishina 2005; Wang et al. 2014a; Blank et al. 2012; Wang und Nakayama 2009).

Sie sind ein wichtiger Faktor für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Homöostase von adulten Geweben.

Studien, die sich mit Knockout-Modellen an Mäusen befassten, verdeutlichten die wesentlichen Funktionen der BMPs. Sie zeigten, dass das Ausschalten der kodierenden BMP-Gene zu einer erhöhten embryonalen Letalität und zur Entwicklung von ausgeprägten Defekten führt (Zhao 2003; Wang et al. 2014a; Deng et al. 2018).

Die BMPs und die mit ihnen verbundenen Signalwege werden durch zwei BMP-Rezeptoren, BMPR1 und BMPR2, gesteuert und reguliert (Miyazono et al. 2010; Koenig et al. 1994; Deng et al. 2018; Nohe et al. 2002).

Wenn das dynamische Gleichgewicht dieser BMP-Signalwege sich verändert, führt dies zu pathologischen Prozessen wie Deformationen des Skeletts und Störungen des Knochenstoffwechsels.

Reguliert werden die BMP-Signalwege und die Aktivität der BMPs durch spezifische Inhibitoren.

Auf extrazellulärer Ebene sind dies Proteine wie Noggin und Chordin (Chien et al. 2020; Xie et al. 2016; Zehentner et al. 2002; Nifuji und Noda 1999; Larraín et al. 2000; Deng et al. 2018). Auf intrazellulärer Ebene wird die Aktivität der BMPs durch inhibitorische SMADs Proteine reguliert (Thielen et al. 2019; Kaiser et al. 2004; Li et al. 2006; Song et al. 2009; Kroon et al. 2017).

Für das Knorpel Tissue Engineering und die Knorpelregeneration könnte das Protein BMP2 ein vielversprechender Wachstumsfaktor sein.

So konnten Studien zeigen, dass BMP2 sowohl die Knochen- als auch Knorpelregeneration in vitro als auch in vivo fördern kann (Majumdar et al. 2001; Thielen et al. 2019; Kovermann et al. 2019; Park et al. 2005; Rosen 2009; Gautschi et al. 2007; Lykissas und Gkias 2017).

Injektionen des Wachstumsfaktors BMP2 in die Kniegelenke von Mäusen führten z.B. zu einer gesteigerten Synthese von Proteoglykanen (van Beuningen et al. 1998).

Eine Studie von Schmal et al. kam zu dem Ergebnis, dass die gemessene Konzentration von BMP2 in Gelenkflüssigkeiten von degenerativen Gelenken ein wichtiger Indikator bei der chirurgisch induzierten Knorpelreparatur und -regeneration ist (Schmal et al. 2010).

In vitro-Studien mit mesenchymalen Stammzellen zeigten, dass durch Zugabe des Wachstumsfaktors BMP2 chondrozytenspezifische Gene exprimiert werden (Zhou et al. 2016; Kovermann et al. 2019; Park et al. 2005; Mehlhorn et al. 2007).

Durch die exogene Zugabe des Wachstumsfaktors BMP2 zu humanen Knorpelzellen konnte die Expression von Kollagen II stimuliert werden (Gründer et al. 2004).

Der Wachstumsfaktor BMP2 fördert die Knorpelzellen in Ihrer Entwicklung und Expansion und könnte dadurch ein unterstützender Faktor für die autologe Chondrozytentransplantation sein.

Weitere Studien zum Wachstumsfaktor BMP2 konnten ein hohes chondrogenes Potential bei der Verwendung von mesenchymalen Stammzellen beobachten und beschreiben (Zhou et al. 2016; Legendre et al. 2017; Shintani et al. 2013; Majumdar et al. 2001; Park et al. 2005; Park et al. 2019; Toh et al. 2005; Shintani & Hunziker 2007; Chen et al. 2016).

Bei der kombinierten Verwendung von BMP2 und TGF- β konnte ein synergistischer Effekt hinsichtlich der Expression von chondrozytenspezifischen Genen beobachtet werden (Shen et al. 2009; Kovermann et al. 2019; Legendre et al. 2017; Shintani et al. 2013).

Darüber hinaus führt die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren zu einem höheren chondrogenen Differenzierungspotential bei gleichzeitig verminderter Tendenz zur Entwicklung einer Hypertrophie.

Deshalb könnte die kombinierte Verwendung von BMP2 und TGF- β ein effektiver Ansatz für das Knorpel Tissue Engineering sein (Shintani & Hunziker 2011; Toh et al. 2005; Mehlhorn et al. 2007; Shintani et al. 2013).

Auch in Verbindung mit Stammzellen scheint die Verwendung von BMPs, insbesondere von BMP2, eine erfolgversprechende Behandlungsstrategie für zukünftige Knorpelreparaturen und das Knorpel Tissue Engineering zu sein.

1.2.3.6 Dexamethason

Glukokortikoide zählen zu den Kortikosteroiden, welche in der Nebennierenrinde als Steroidhormone gebildet werden (Becker 2013; Aktories et al. 2005).

Glukokortikosteroide haben eine Vielzahl physiologischer Wirkungen, die für das Leben unerlässlich sind (Becker 2013; Lu et al. 2011).

Ihre klinische Anwendung beruht weitgehend auf ihren entzündungshemmenden und immunsuppressiven Eigenschaften (Coutinho und Chapman 2011; Ronchetti et al. 2018; van der Velden 1998).

Die pharmakologischen Anwendungen der Glukokortikoide sind vielfältig (Shaikh et al. 2012).

Dexamethason ist ein sogenanntes künstliches Glukokortikoid. Die Wirkungsstärke ist rund 25-mal stärker als die des körpereigenen Kortisols (Marischler 2014; Shaikh et al. 2012).

Aus diesem Grund wird Dexamethason bei vielen klinischen Indikationen eingesetzt, unter anderem bei Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Prozessen und Osteoarthritis (Kroot et al. 2006; Lashina et al. 2000; Coutinho & Chapman 2011; Zhang et al. 2016).

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Synoviale Stammzellen stellen eine vielversprechende Zellpopulation für das stammzellbasierte Knorpel Tissue Engineering dar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Stammzellen der synovialen Membran daraufhin zu untersuchen, wie sie sich in vitro unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und dem Einfluss von Dexamethason chondrogen differenzieren können.

Üblicherweise benötigen mesenchymale Stammzellen anderen Ursprungs wie unter anderem dem Knochenmark in vitro Dexamethason für die chondrogene Differenzierung. Das Glukokortikoid Dexamethason ist in allen Protokollen, unabhängig davon, ob es um die adipogene, die osteogene oder die chondrogene Differenzierungslinie geht, aufgeführt.

Dabei wird übersehen, dass Zellen unterschiedlicher Herkunft individuell auf die jeweiligen Komponenten der Differenzierungsprotokolle reagieren könnten.

Aufgrund des epigenetischen Gedächtnis mesenchymaler Stammzellen und der daraus resultierenden unterschiedlichen Zellantwort auf Umweltbedingungen liegt es nahe, dass je nach Ursprungsgewebe ein anderes Differenzierungsmedium erforderlich sein könnte (Pizzute et al. 2015; Collins et al. 2014).

In diesem Zusammenhang ist es interessant zu untersuchen, ob synoviale Stammzellen des Kniegelenkes ebenfalls Dexamethason für die chondrogene Differenzierung benötigen.

Zwei weitere Komponenten dieses Differenzierungsmediums stellen unter anderem der Wachstumsfaktor TGF- β und BMP2 dar. Darüber hinaus wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit die Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β alleine oder in Kombination die chondrogene Differenzierung von SDSCs in vitro fördern können und welchen Einfluss Dexamethason auf die jeweiligen Wachstumsfaktoren alleine und in Kombination hat.

Folgende spezifische Fragestellungen werden hierzu untersucht:

- 1) Wie reagieren humane synoviale Stammzellen auf unterschiedliche Konzentrationen der Wachstumsfaktoren bone morphogenetic protein 2 und transforming growth factor- β alleine und in Kombination?
- 2) Wie beeinflusst das Glukokortikoid Dexamethason humane synoviale Stammzellen während der chondrogenen Differenzierung?

2 Material und Methoden

2.1 Grundkonzept des Projektes

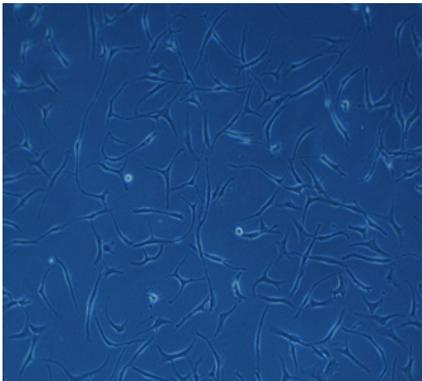
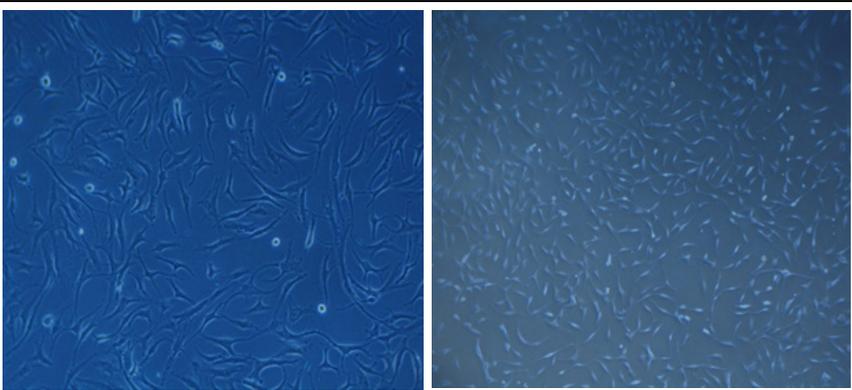
Humane synoviale Stammzellen wurden aus der Synovialmembran aus Kniegelenken isoliert, in Zellkulturflaschen kultiviert und vermehrt. Anschließend fand eine 21 tägige Zelldifferenzierung mit den Zellpellets dieser synovialen Stammzellen statt. Die beiden Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und BMP2 wurden alleine und in Kombination verwendet. Die Funktion und Aufgabe von Dexamethason während dieser Zelldifferenzierung wurden dabei näher untersucht. Nach 21 Tagen erfolgten die histologischen, makroskopischen, biochemischen und molekularbiologischen Analysen. Mit Hilfe dieses Projektes können vielleicht Rückschlüsse auf mögliche Therapieansätze gezogen werden, die in weiterer Zukunft in der Klinik verwirklicht und umgesetzt werden könnten.

2.2 Isolierung synovialer Stammzellen

Die chondrogene Differenzierung wurde an isolierten humanen Stammzellen aus der Synovialmembran des Kniegelenkes induziert (n = 4: männlich, 42 Jahre, männlich, 41 Jahre, männlich, 19 Jahre, männlich, 54 Jahre; erhalten mit vollständiger Zustimmung der Ethikkommission der Universität Freiburg im Rahmen des Projekts „Gewebebank für Forschung im Bereich Tissue Engineering“ (GTE-2002) und der Biobank „Osteo“ (AN-EK-FRBRG-135/14)). Die Proben wurden in einer 1: 3 Betaisodona / phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) und in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium mit 4,5 g / l Glucose (DMEM-HG; Gibco, Thermo Fisher, Zürich, Schweiz) gewaschen und dann in einer CollP-Lösung (1%Kollagenase) bei 37 ° C für 4 h inkubiert. Nach der Gewebeverdauung wurden die Suspensionszellen 5 Minuten bei 500 × g zentrifugiert, gesammelt und zur Expansion mit DMEM-HG in T-Flaschen gefügt.

hSDSCs wurden mit einer Dichte von 3000 Zellen / cm² in DMEM-HG ausgesät, das 10% MSC-qualifiziertes fötales Rinderserum (FBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland), 100 E / ml Penicillin und 100 ug / ml Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher, Zürich, Schweiz) und 5 ng / ml rekombinanter menschlicher basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, Fitzgerald Industries International, Acton, MA, USA) enthält. Die Zellen wurden bei 37 ° C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂ und 85% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde jeden 2. Tag bis zu einer Konfluenz von 70% gewechselt. Ab einer Zelldichte von 70 % wurden die Zellen trypsiniert und gezählt für die weitere 21-tägige Zelldifferenzierung.

Abbildung 1: Zellwachstum der synovialen Stammzellen im serumhaltigen chondrogenen Wachstumsmedium (Tag 1, 2, 3 und 6).

Tag 1	
Tag 2	
Tag 3	
Tag 6	

2.3 Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung der synovialen Stammzellen wurde mit einer 3D-Zellpelletkultur durchgeführt. Dabei wurden Zellpassagen von 2 bis 3 genommen.

Eine quantitative Zellzahl von 2×10^5 synovialen Stammzellen befanden sich als Zellpellet in einer V-Boden 96-fach-Platte (Costar #3894). Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 500g waren die Zellen als Sediment an den Boden angelagert und konnten als 3D-Organisation gewonnen werden. Um eine chondrogene Differenzierung zu einem knorpelartigen Phänotyp zu gewährleisten, wurde ein Nährmedium für eine chondrogene Differenzierung verwendet. Dabei orientierte sich das Protokoll an Johnstone et al. Das Nährmedium enthielt Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies USA), 1% nicht essentielle Aminosäuren (ThermoFisher), 1% ITS+ (Corning), 100nm Dexamethason (Fitzgerald), 5 µg/ml Ascorbic acid-2 phosphate und 10ng/ml TGF-β1 (Fitzgerald).

Ein Teil der generierten Gruppen enthielt 1ng/ml TGF-β1 alleine oder in Kombination mit dem Wachstumsfaktor BMP2 in einer Konzentration von 1,5 oder 10ng/ml. Einige Gruppen von Zellen wurden nur mit dem BMP2-Wachstumsfaktor in den Konzentrationen 1,5 und 10 ng/ml versetzt. Die untersuchten Gruppen wurden entweder in Abwesenheit oder in Anwesenheit von Dexamethason kultiviert. Jeden zweiten Tag wurden die unterschiedlichen Medien für die Zellkulturen erneuert bis zum Tag 21, an dem alle Zellpellets gesammelt wurden, um weiterführende Analysen vorzunehmen.

Abbildung 2: Zusammensetzung der einzelnen Medien ohne Dexamethason

Gruppe 1		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9700ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Gruppe 2		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9598ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	
TGF β1 (conc)	1 ng/ml	1 ul
Ascorbic acid (conc)	50 µg/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	1 ng/ml	1 ul
Gruppe 3		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9594ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	
TGF β1 (conc)	1 ng/ml	1 ul
Ascorbic acid (conc)	50 µg/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	5 ng/ml	5 ul
Gruppe 4		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9589ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	
TGF β1 (conc)	1 ng/ml	1 ul
Ascorbic acid (conc)	50 µg/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	10 ng/ml	10 ul

Gruppe 5		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9599ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	
Ascorbic acid (conc)	50 µg/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	1 ng/ml	1 ul
Gruppe 6		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9595ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	
Ascorbic acid (conc)	50 µg/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	5 ng/ml	5 ul
Gruppe 7		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9590ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	
Ascorbic acid (conc)	50 µg/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	10 ng/ml	10 ul
Gruppe 8		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9599ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	
Ascorbic acid (conc)	50 µg/ml	100 ul
TGF β1 (conc)	1 ng/ml	1 ul
Gruppe 9		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9590ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	
Ascorbic acid (conc)	50 µg/ml	100 ul
TGF β1 (conc)	10 ng/ml	10 ul

Abbildung 3: Zusammensetzung der einzelnen Medien mit Dexamethason

Gruppe 1		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9690ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
Gruppe 2		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9588ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
TGF β 1 (conc)	1 ng/ml	1 ul
Ascorbic acid (conc)	50 μ g/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	1 ng/ml	1 ul
Gruppe 3		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9584ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
TGF β 1 (conc)	1 ng/ml	1 ul
Ascorbic acid (conc)	50 μ g/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	5 ng/ml	5 ul
Gruppe 4		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9579ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
TGF β 1 (conc)	1 ng/ml	1 ul
Ascorbic acid (conc)	50 μ g/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	10 ng/ml	10 ul

Gruppe 5		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9589ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
Ascorbic acid (conc)	50 μ g/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	1 ng/ml	1 ul
Gruppe 6		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9585ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
Ascorbic acid (conc)	50 μ g/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	5 ng/ml	5 ul
Gruppe 7		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9580ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
Ascorbic acid (conc)	50 μ g/ml	100 ul
BMP2 (10 ug/ml)	10 ng/ml	10 ul
Gruppe 8		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9589ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
Ascorbic acid (conc)	50 μ g/ml	100 ul
TGF β 1 (conc)	1 ng/ml	1 ul
Gruppe 9		
Chondrogenic medium	Cf	10 ml
Medium	DMEM high glucose	9580ul
Non essential AA (11140-35)	1%	100ul
ITS+	1%	100 ul
Pen/Strep	1%	100 ul
Dex (conc)	100nM	10 ul
Ascorbic acid (conc)	50 μ g/ml	100 ul
TGF β 1 (conc)	10 ng/ml	10 ul

2.4 Analysen

2.4.1 Quantitative Polymerasekettenreaktions (PCR)-Analyse in Echtzeit

Die Gesamt-RNA wurde am Tag 0 und nach 21 Tagen der chondrogenen Differenzierung unter Verwendung von TRI Reagent®-Lösung (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers aus hSDSCs isoliert. Die Menge und Qualität der RNA wurde mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher, Zürich, Schweiz) gemessen. Für die reverse Transkription (RT) von 1 µg Gesamt-RNA wurde das TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Die RT-Reaktion wurde für 10 min bei 25° C durchgeführt, anschließend für 30 min bei 42° C. Gestoppt wurde die Reaktion durch 5minütiges Erhitzen auf 85° C. Die Reaktionen zur relativen Genexpression (quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)) wurden in 10 µL Reaktionsmischungen durchgeführt, die TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher, Zürich, Schweiz), den geeigneten Satz von Primern und Sonden, DEPC-H₂O und cDNA-Matrize enthielten. Das Reaktionsprogramm war wie folgt aufgebaut: 50° C für 2 min, 95° C für 10 min und 40 Zyklen von 95° C für je 15 s, gefolgt von einem Annealing/Extension (Tempern / Dehnen) -Schritt bei 60° C für 1 min. Alle qPCR-Läufe wurden mit dem StepOne Studio-Echtzeit-PCR-System (Thermo Fisher, Zürich, Schweiz) durchgeführt. Technische Triplikate wurden für jeden Zyklus und für die verschiedenen Spender (biologische Replikate) verwendet.

Die relative Expression der Gene COL2, COL10, ACAN, RUNX2, SOX9, SP7 (Osterix), MMP13 und PPARG während der chondrogenen Differenzierung wurden unter Verwendung der 2^{-ΔΔCt} -Methode mit dem ribosomalen Protein P0 (RPLP0) als Referenzgen bestimmt, und die Tag-0-Probe (vor der chondrogenen Differenzierung) wurde als Kalibrator benutzt.

Primer- und Sondensequenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt, während die Katalognummern von Assays-on-Demand (Applied Biosystems, Foster City, USA) in Tabelle 2 dargestellt werden.

Tabelle 1: Übersicht über die Gensequenzen der untersuchten Marker

Name of Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Probe
hRPLP0	TGG GCA AGA ACA CCA TGA TG	CGG ATA TGA GGC AGC AGT TTC	AGG GCA CCT GGA AAA CAA CCC AGC
Col2	GGC AAT AGC AGG TTC ACG TAC A	GAT AAC AGT CTT GCC CCA CTT ACC	CCT GAA GGA TGG CTG CAC GAA ACA TAC
Runx2	AGC AAG GTT CAA CGA TCT GAG AT	TTT GTG AAG ACG GTT ATG GTC AA	TGA AAC TCT TGC CTC GTC CAC TCC G
Col10	ACG CTG AAC GAT ACC AAA TG	TGC TAT ACC TTT ACT CTT TAT GGT GTA	ACT ACC CAA CAC CAA GAC ACA GTT CTT CAT TCC
MMP13	CGG CCA CTC CTT AGG TCT TG	TTT TGC CGG TGT AGG TGT AGA TAG	CTC CAA GGA CCC TGG AGC ACT CAT GT
Col1	CCC TGG AAA GAA TGG AGA TGA T	ACT GAA ACC TCT GTG TCC CTT CA	CGG GCA ATC CTC GAG CAC CCT

Tabelle 2: Primers on demand

Name of Gene	Catalogue number
Sox9	Hs00165814_m1
ACAN	Hs01050178_m1
Osterix (SP7)	Hs00541729_m1
PPAR- γ	HS00234592_m1

2.4.2 Histologische Färbungsanalyse

Nach 21 Tagen in verschiedenen Kulturmedien wurden die Proben geerntet und in 70% Methanol fixiert. Einen Tag vor dem Schneiden wurde die Methanollösung durch 5%ige Saccharose ersetzt, und die Proben wurden in Kryoschnitte mit einer konstanten Dicke von 10 μm zerlegt (Microm HM560).

2.4.3 Makroskopische Bewertung

Eine morphologische Analyse wurde an ungeschnittenen Pellets durchgeführt, um die möglichen Form- und Größenunterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten. Die Pellets wurden auf einer Glasseite gesammelt und mit 100 μl 70%igem Methanol bedeckt. Mit einem 2,5-fach Objektiv auf einem Zeiss AxioPlan-Mikroskop (Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) wurden die Pellets fotografiert. Radiusmessungen wurden mit AxioCam-Software (Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

2.4.4 Safranin-O / Fast Green-Färbung

Die Safranin-O-Färbung wurde an den Proben am Tag 21 durchgeführt. Die Objektträger werden in dH₂O gewaschen, um die Kryoverbindung zu entfernen, dann mit Weigerts Haematoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 Minuten lang gefärbt und in Leitungswasser für 10 min gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend 6 min mit Fast Green (Fluka # 51275) und 15 min mit Safranin-O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gefärbt, gefolgt von einem Waschen mit dH₂O. Nach Dehydratisierung mit steigenden Ethanolkonzentrationen wurden die Proben in Xylol überführt und mit Eukitt-Eindeckmedium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) abgedeckt.

2.4.5 Von Kossa-Färbung

Die Von-Kossa-Färbung für Calcium- und Mineralablagerung wurde an Pellets am Tag 21 durchgeführt. Die Objektträger wurden in dH₂O gewaschen, um die Kryoverbindung zu entfernen, und dann 30 Minuten in einer 5%igen Silbernitratlösung (Fluka # 85230) in direktem Sonnenlicht inkubiert. Nach dem Spülen in dH₂O wurden die Objektträger mit einer 5%igen Natriumthiosulfatlösung (Fluka # 72050) fixiert, erneut in dH₂O gespült und zur Gegenfärbung in eine kernrote Lösung (Fluka # 60700) überführt. Nach Dehydratisierung mit steigenden Ethanolkonzentrationen wurden die Proben in Xylol überführt und dann mit Eukitt-Eindeckmedium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) abgedeckt.

2.4.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie für Kollagen 2 (CII) wurde unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers durchgeführt, der von der Iowa University zur Verfügung gestellt wurde. Nach einem anfänglichen Waschen in dH₂O zur Entfernung des Kryocompounds wurden die Objektträger 30 Minuten in Methanol transferiert, unspezifische Bindungsstellen wurden mit Pferdeserum (Vector Laboratories # S-2000; Verdünnung 1:20) für eine Stunde blockiert. Primärantikörper Maus-Anti-Kollagen 2 (CII) (DSHB, Iowa, USA) wurden 30 Minuten lang zugegeben (Verdünnung 1: 6), gefolgt von einer Inkubation in biotinyliertem Anti-Maus-IgG (H + L)-Sekundärantikörper (Vector Laboratories # BA- 2001; Verdünnung 1: 200) und einer zweiten Inkubation in Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories # PK-6100). ImmPACT DAB-Lösung (Vector Laboratories # SK-4105) wurde 4 Minuten lang als Substrat für Peroxidase zugegeben. Die Gegenfärbung wurde unter Verwendung von Mayers Haematoxylin (Fluka # 51275) für 20 Sekunden durchgeführt. Nach der Dehydratisierung mit steigenden Ethanolkonzentrationen wurden die Proben in Xylol überführt und dann mit Eukitt-Eindeckmedium (Sigma-Aldrich) abgedeckt. Das AxioPlan-Mikroskop Zeiss wurde mit 10facher und 40facher Vergrößerung verwendet.

2.4.7 Immunfluoreszenz

Nach einem anfänglichen Waschen in dH₂O zur Entfernung der Kryoverbindung wurden die Objektträger für 20 Minuten in Methanol überführt. Die nicht spezifischen Bindungsstellen wurden mit 10% FBS und PBS / Tween 20 Minuten lang blockiert. Primärantikörper Anti-Typ-II-Kollagen (CIIcI, siehe Bestätigungsabschnitt) in einer Konzentration 5 µg/ml wurde 1 h bei Raumtemperatur zugegeben. Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen, dann wurde der sekundäre Antikörper 1 Stunde lang bei 37° C zugegeben (Alexa Fluor 488 IgG 1: 800). Nach dem Waschen mit PBS wurden die Kerne mit 2 (4-Amidinophenyl) -1H-indol-6-carboxamidin (DAPI) 2,5 µg/ ml gegengefärbt und dann mit Eukit-Eindeckmedium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) abgedeckt.

2.4.8 Glycosaminoglycan (GAG) / DNA-Messung

Die Pelletproben wurden nach 21 Tagen mit 0,5 mg / ml Proteinase-K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) über Nacht bei 56° C verdaut, gefolgt von 10-minütiger Deaktivierung bei 95° C. Der DNA-Gehalt wurde mit Hoechst 33, 258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) unter Verwendung eines Mikroplattenlesegeräts (Victor3 Micro Plate Reader, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) mit einer Anregung bei 360 nm und einer Emission bei 465 nm gemessen in Anlehnung an veröffentlichte Methodik (Labarca und Paigen 1980). Die Menge an Glycosaminoglycan (GAG) in den Gerüsten und im Medium wurde mit der Dimethylmethylblau-Farbmethode bestimmt (FARNDALE et al. 1986).

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism 7.03-Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Es wurde eine nichtparametrische bidirektionale Varianzanalyse (ANOVA) in Verbindung mit dem mehrfachen Vergleichstest von Tukey angewendet. $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Eine Zwei-Wege-ANOVA wurde verwendet, um die Verteilung und die Homogenitätsvarianz in den Gruppen zu bewerten; Der Mehrfachvergleich des Tukey wurde verwendet, um die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen zu bewerten.

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Um die Rolle der Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β 1 alleine und in Kombination während der chondrogenen Differenzierung synovialer Stammzellen näher zu bestimmen und zu verstehen, wurden die Zellpellets, welche einer 21 tägigen Differenzierung ausgesetzt waren, mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR (qPCR) auf bestimmte Gene untersucht. Zum einen wurden die sogenannten chondrogenen Marker-Gene, welche bei einer positiven chondrogenen Differenzierung vermehrt exprimiert werden, untersucht. Auf der anderen Seite wurden die sogenannten „hypertrophen“ Marker bzw. osteogenen Marker näher betrachtet. Diese wurden bei einer Differenzierung, die über den stabilen Chondrozyten-Phänotyp hinaus geht, vermehrt exprimiert.

3.1.1 Einfluss von TGF- β 1 und BMP2 auf die chondrogenen Differenzierungs-marker Aggrekan und Kollagen 2

Der mRNA-Gehalt der Zellen an den beiden Markern Aggrekan (Aggrecan) und Kollagen 2 (Col2), welche mit einer chondrogenen Differenzierung assoziiert sind, erhöhte sich in allen mit Wachstumsfaktoren kultivierten Zellen, unabhängig von der Anwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason. Die Genexpression von Aggrekan war in allen Gruppen höher, wenn die Zellen nicht Dexamethason ausgesetzt waren. Bei Kombination von 1ng TGF- β (1ng/ml) mit steigenden Konzentrationen von BMP2 (1,5,10 ng/ml) erhöhte sich die Aggrekan-mRNA-Expression gegenüber jenen Gruppen mit keinem oder nur einem der beiden Wachstumsfaktoren, unabhängig von der Anwesenheit von Dexamethason. Die höchste mRNA-Genexpression von Aggrekan wurde bei der Kombination von 1ng TGF- β und 10ng BMP2 ohne Dexamethason festgestellt. Die Genexpression war unter dieser Kombination gegenüber den Zellen, die nur mit 10ng TGF- β kultiviert waren, signifikant erhöht.

Bei alleiniger Verwendung des Wachstumsfaktors TGF- β in der Konzentration von 1 und 10ng konnte eine Erhöhung der mRNA-Genexpression von Kollagen 2 beobachtet werden, unabhängig von der An-oder Abwesenheit von Dexamethason.

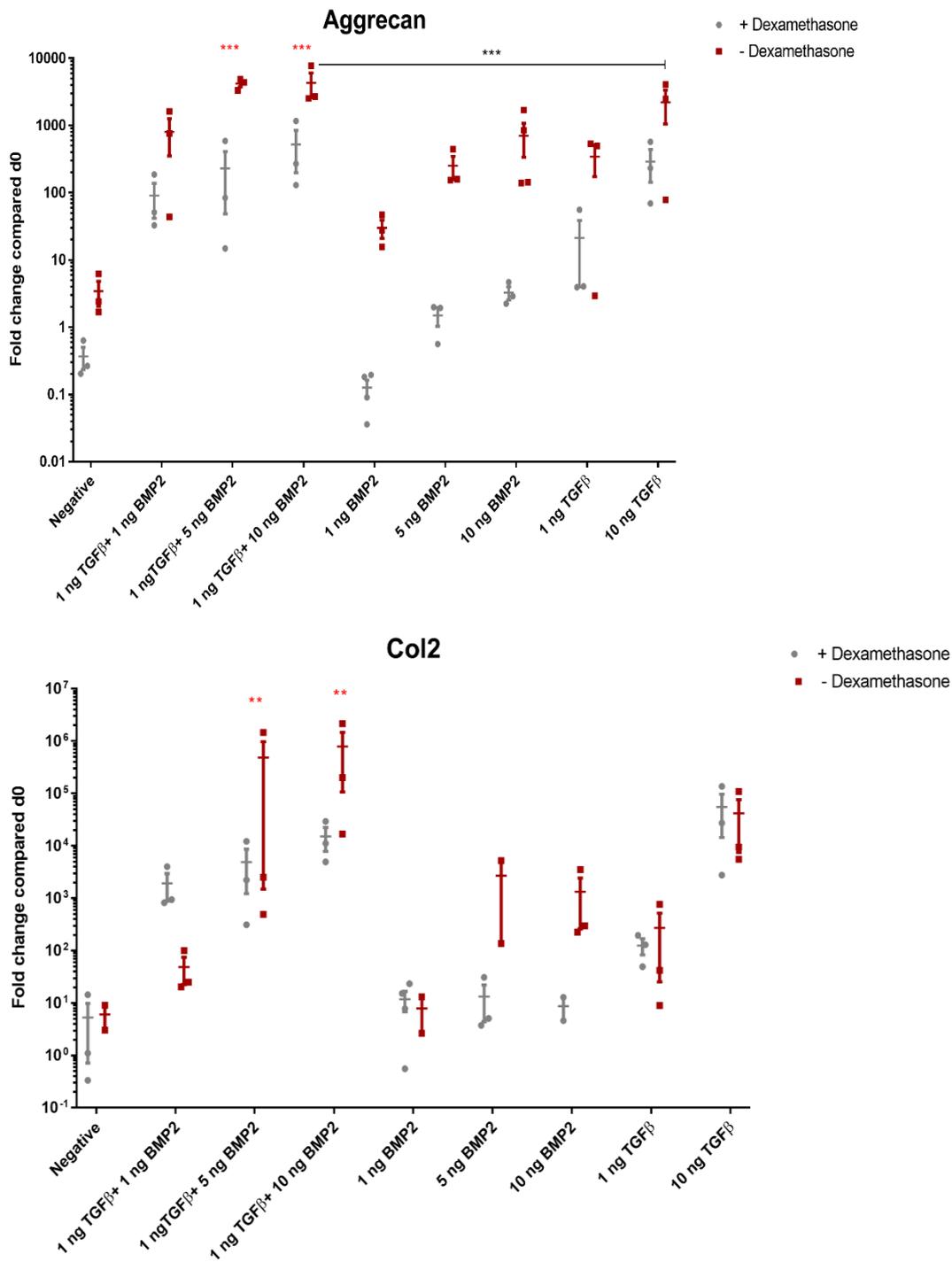
In jenen Zellen, die nur mit dem Wachstumsfaktor BMP2 kultiviert wurden, stieg die Kollagen2-mRNA-Expression erst bei höheren Konzentrationen ab 5ng BMP2 an, vorausgesetzt, Dexamethason befand sich nicht im Zelldifferenzierungsmedium.

Unter der Kombination von 1ng TGF- β und steigender Konzentration von BMP2 (1,5,10ng) zeigte sich, wie auch schon für das Gen Aggrekan, ein synergistischer Effekt hinsichtlich des

mRNA-Gehaltes von Kollagen 2 in den Zellen. In allen drei Konzentrationen konnte ein Unterschied, ab 5ng BMP2 sogar ein signifikanter Unterschied, zwischen dexamethason-freiem und dexamethasonhaltigem Medium beobachtet werden.

Folglich induzieren TGF- β und BMP2 alleine und in Kombination eine chondrogene Differenzierung synovialer Stammzellen.

Abbildung 4: Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion der chondrogenen Marker Aggrekan und Kollagen 2 ohne und mit Zugabe von Dexamethason.

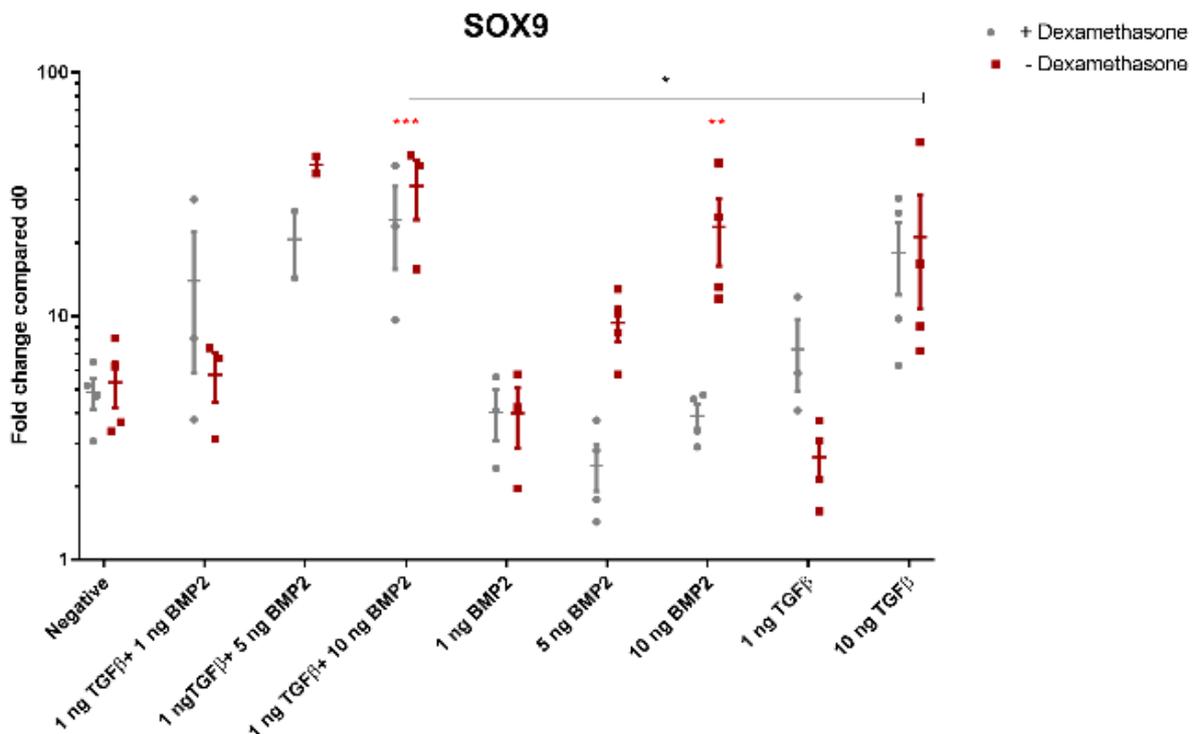


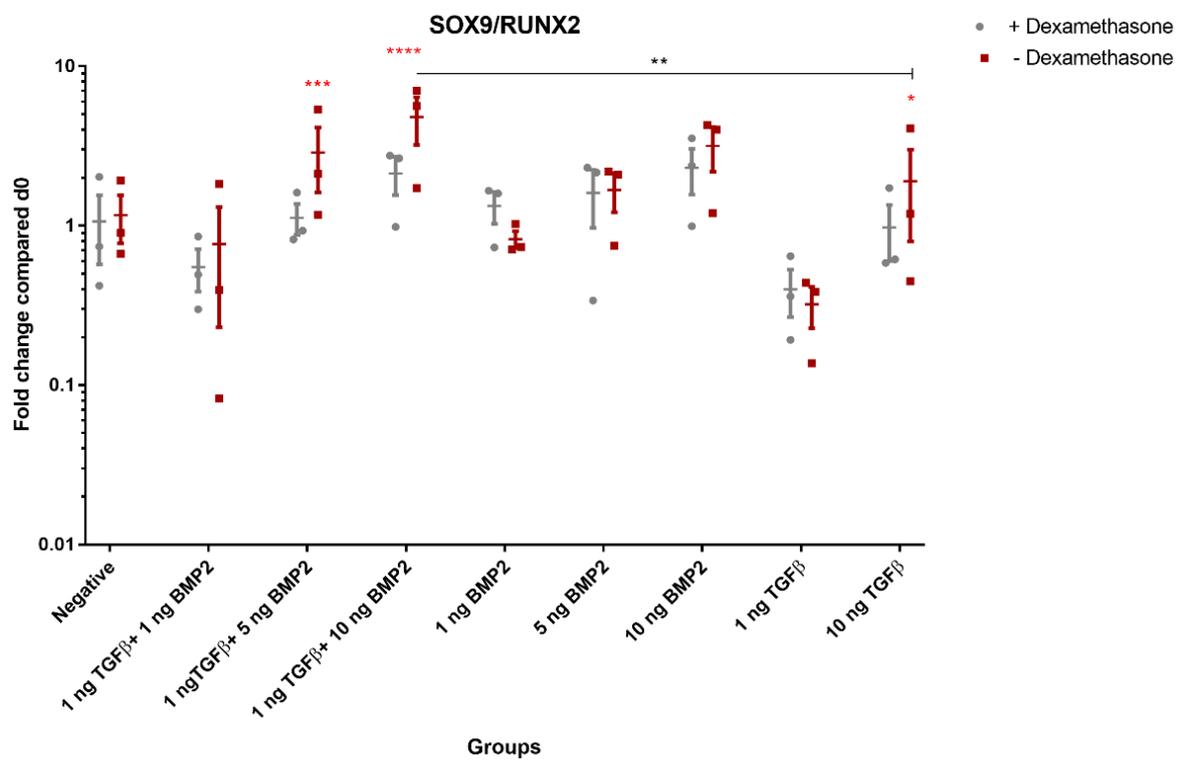
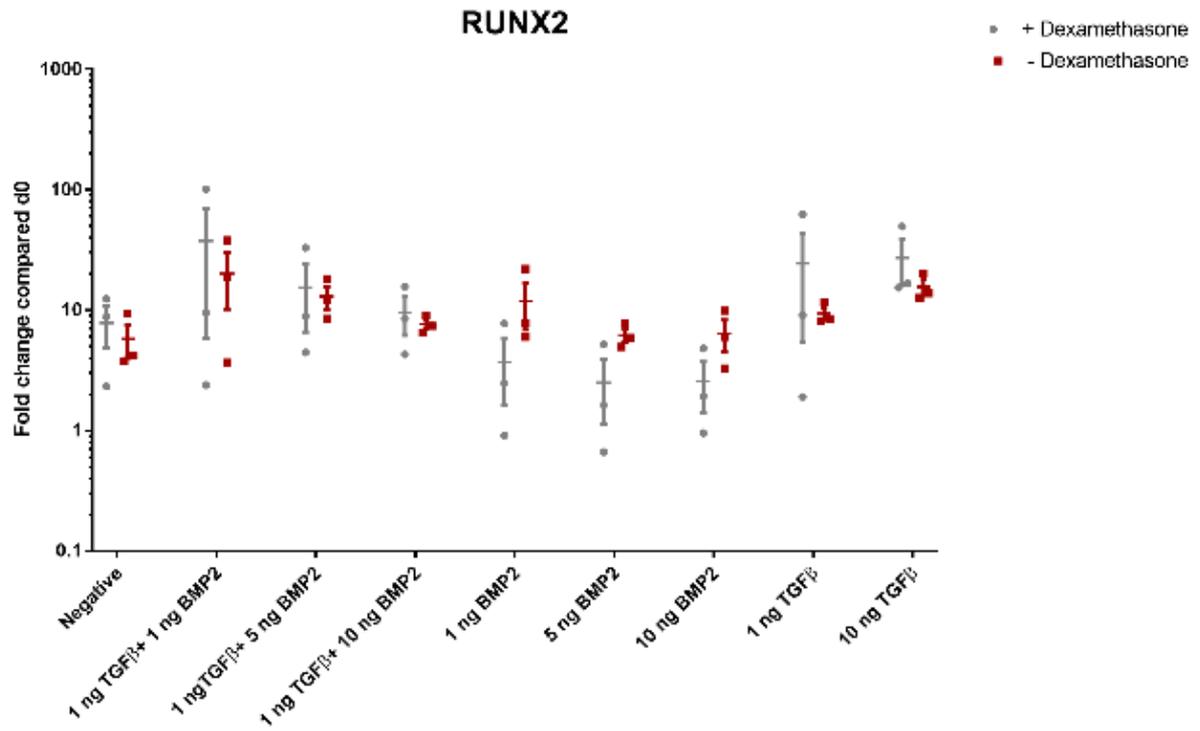
3.1.2 SOX9/RUNX2-Verhältnis als Maß für das chondrogene Potential humaner synovialer Stammzellen in vitro

Neben den beiden chondrogenen Markern Aggrekan und Kollagen 2 wurde die Expression von zwei an der osteochondralen Differenzierung beteiligten Transkriptionsfaktoren untersucht. Dabei handelt es sich um die Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2. Frühere Studien haben gezeigt, dass das RUNX2/SOX9-Verhältnis ein vielversprechender und früher Prädiktor für das osteogene Potential von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks in vitro ist (Loebel et al. 2015).

Der Transkriptionsfaktor RUNX2 blieb von den verschiedenen Bedingungen weitgehend unberührt. Unabhängig von der An-oder Abwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason im Medium zeigten jene Zellen, die nur mit dem Wachstumsfaktor BMP2 in unterschiedlichen Konzentrationen(1,5,10ng) kultiviert wurden, eine geringere Gen Expression von RUNX2 im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem Wachstumsfaktor TGF- β (1,10ng) kultiviert wurden. Bei Kombination des Wachstumsfaktors BMP2 mit 1ng TGF- β wurde sowohl unter An- als auch Abwesenheit von Dexamethason eine Tendenz zum Absinken des mRNA-Spiegels für RUNX2 mit steigender Konzentration des BMP2 deutlich.

Abbildung 5: Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP-2 auf die mRNA Produktion der Marker SOX9 und RUNX2 ohne und mit Zugabe von Dexamethason





3.1.3 Einfluss von TGF- β auf die Kollagen 10-Genexpression

Die Genexpression von Kollagen 10 wurde durch die alleinige Anwendung des Wachstumsfaktors TGF- β (1,10ng) erhöht. Interessanterweise stieg die Expression dieses Gens in dexamethasonhaltigem Medium weiter an. Im Gegensatz dazu wurde bei der alleinigen Anwendung des Wachstumsfaktors BMP2 in unterschiedlichen Konzentrationen (1,5,10ng) sowohl unter Anwesenheit als auch unter Abwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason das Kollagen-10-mRNA-Level geringfügig erhöht.

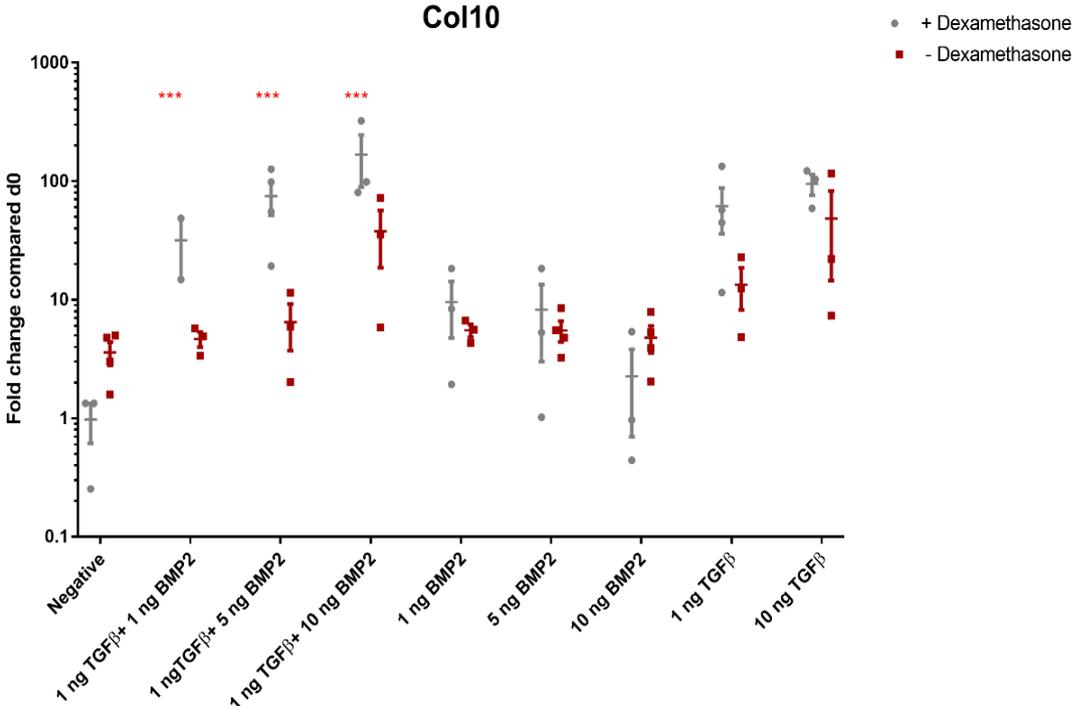
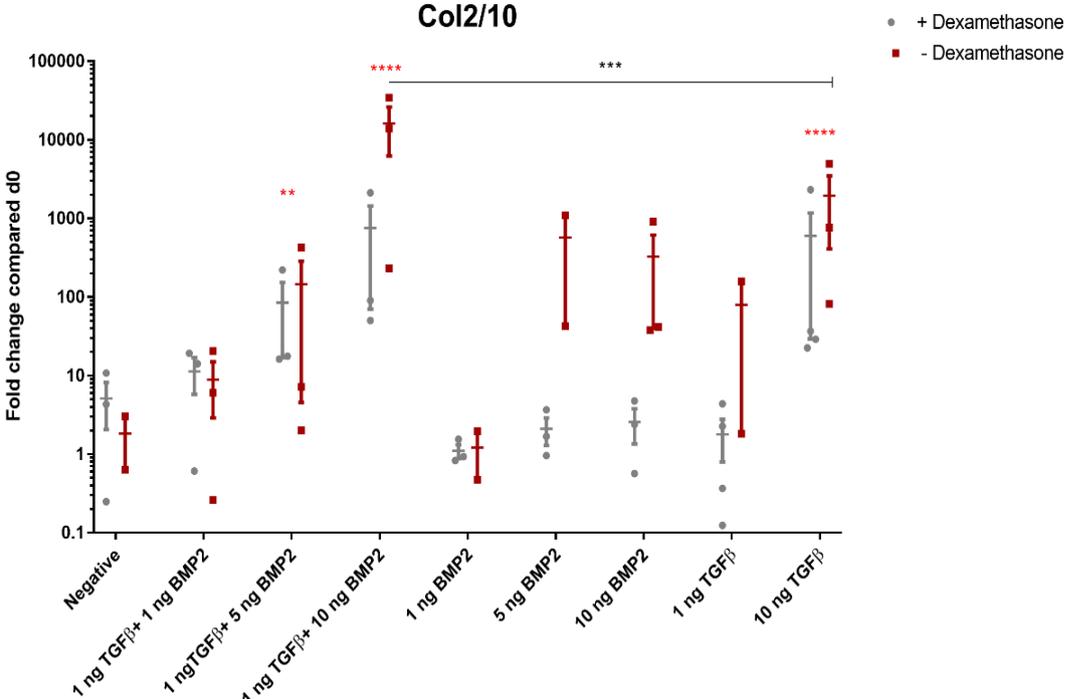
Bei der Kombination des Wachstumsfaktors BMP2 in unterschiedlichen Konzentrationen (1,5,10ng) mit 1ng TGF- β wurde der Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason auf die Genexpression von Kollagen 10 am offensichtlichsten.

Wurde eine geringe Konzentration von 1ng TGF- β mit 1ng und 5ng des Wachstumsfaktors BMP2 kombiniert, zeigte sich bei dexamethasonfreiem Medium kein Anstieg der Kollagen-10-Genexpression. Hingegen kam es bei Zugabe von Dexamethason in das Differenzierungsmedium zu einem Anstieg der Kollagen-10-Genexpression in denselben Gruppen.

Bei einer Konzentration von 10ng BMP2 in Kombination mit 1ng TGF- β erhöhte das Glukokortikoid Dexamethason ebenfalls das mRNA-Level von Kollagen 10 gegenüber dem dexamethasonfreien Medium. Darin zeigt sich der Einfluss von Dexamethason in Anwesenheit von TGF- β auf das Hypertrophieverhalten der Zellen

Bei der Bestimmung Verhältnisses von Kollagen 2 zu Kollagen 10 zur Ermittlung der Stabilität der chondrogenen Differenzierung konnte bei der alleinigen Verwendung von 10 ng TGF- β sowohl im dexamethasonfreien als auch im dexamethasonhaltigen Medium ein Anstieg dieses Verhältnisses beobachtet werden. Dagegen zeigte sich bei einer geringen Konzentration von TGF- β (1ng) bei Abwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason ein höheres Verhältnis von Kollagen 2 zu Kollagen 10. Bei der alleinigen Anwendung des Wachstumsfaktors BMP2 in den Konzentrationen 1 und 5ng ergab sich bei Abwesenheit von Dexamethason ein höheres Kollagen 2/Kollagen 10-Verhältnis. Somit exprimierten diese Zellen bei höheren BMP2-Konzentrationen mehr Kollagen 2 als Kollagen 10. Bei einer geringen Konzentration von 1ng BMP2 konnte kein Einfluss von Dexamethason auf das Verhältnis festgestellt werden. Dieselbe Tendenz konnte in der Kombination von 1ng TGF- β mit unterschiedlichen Konzentrationen von BMP2 (1,5,10ng) beobachtet werden. Mit steigender Konzentration des Wachstumsfaktors BMP2 stieg das Kollagen 2 / Kollagen 10-Verhältnis dosisabhängig an. Dieser Anstieg war bei Abwesenheit von Dexamethason bei den höheren Konzentrationen von BMP2 (5,10ng) signifikant erhöht.

Abbildung 6: Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion von COL2/10 ohne und mit Zugabe von Dexamethason.



3.1.4 Einfluss von Dexamethason auf die Genexpression von MMP13 und von BMP2 auf die Genexpression von Kollagen 1

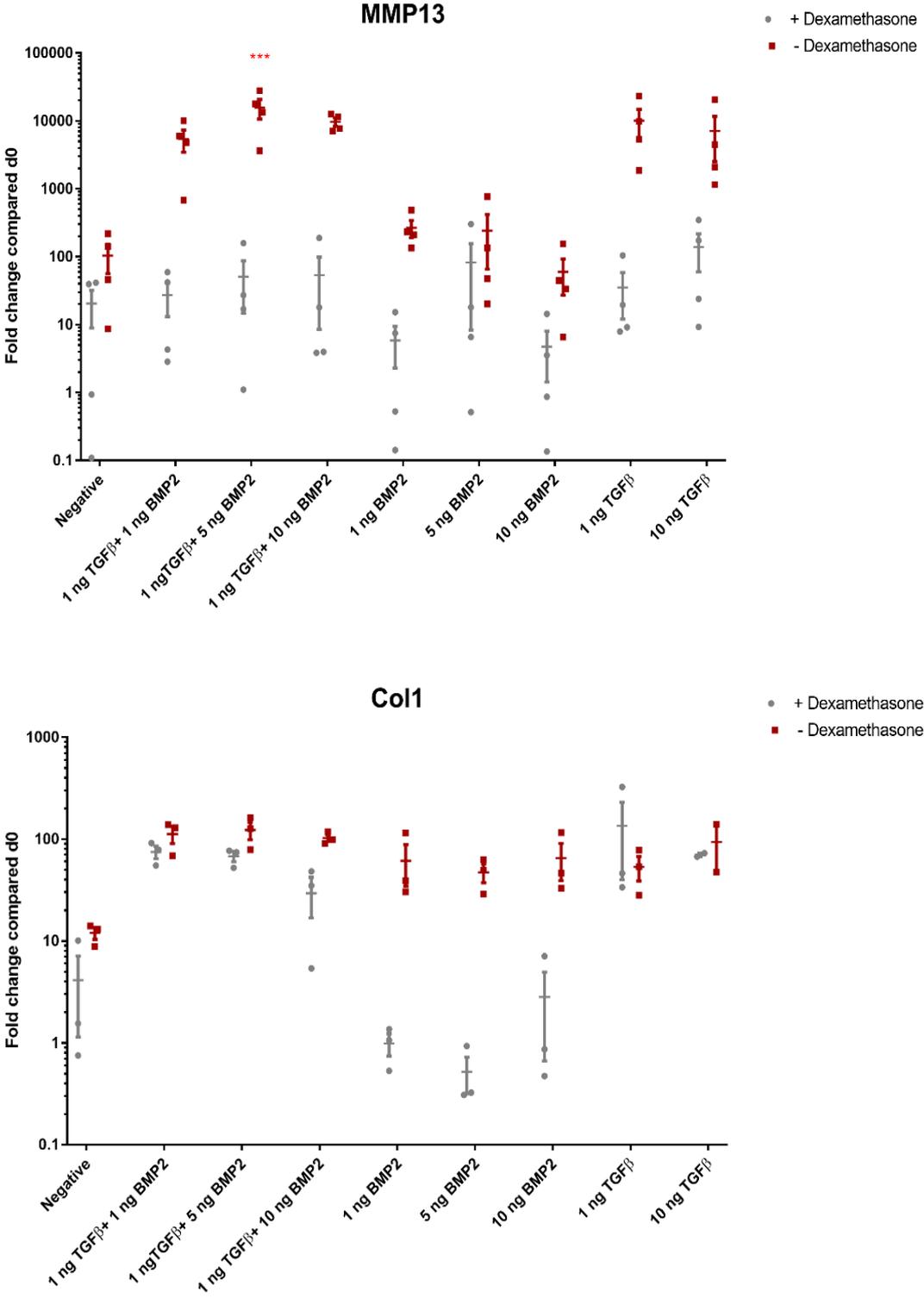
Ein weiteres Gen, welches für die Beurteilung der Qualität der chondrogenen Differenzierung verwendet wird, ist Kollagen 1. Kollagen 1 ist eine wichtige fibrilläre Komponente von sogenanntem Faserknorpel. Anhand dieses Genes kann bestimmt werden, ob die chondrogene Differenzierung mehr in Richtung hyaliner Knorpel oder Faserknorpel verläuft. Dafür wurden das Kollagen 1 und das Kollagen 2 / Kollagen 1-Verhältnis als Marker verwendet und untersucht.

Die Expression von Kollagen 1 wurde durch den Wachstumsfaktor TGF- β , unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Dexamethason und der Konzentration von 1 oder 10ng, gegenüber der negativen Kontrollgruppe erhöht. Bei jenen Zellen, die nur den Wachstumsfaktor BMP2 im Medium hatten, konnte interessanterweise eine Genexpression von Kollagen 1 nur bei der Abwesenheit von Dexamethason festgestellt werden. Steigende Konzentrationen des Wachstumsfaktors BMP2 (1,5,10ng) in Kombination mit 1ng TGF- β erhöhten die Kollagen 1-Genexpression gegenüber der alleinigen Anwendung von BMP2, insbesondere bei Einsatz von Dexamethason.

Das höchste Kollagen 2 / Kollagen 1-Verhältnis wurde mit der Kombination des Wachstumsfaktors BMP2 (10ng) in Kombination mit 1ng TGF- β ohne die Zugabe von Dexamethason erzielt. Das Verhältnis von Kollagen 2 zu Kollagen 1 war in dieser Gruppe sowohl gegenüber der Gruppe mit Anwesenheit von Dexamethason als auch gegenüber der Verwendung von 10ng TGF- β signifikant erhöht.

MMP13 (Matrix Metalloproteinase 13) ist ein Gen, welches ein Protein kodiert, das beim Abbau von extrazellulären Matrixproteinen beteiligt ist. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem Kollagen und Aggrecan. Unter dem Einfluss des Glukokortikoids Dexamethason wurde in allen Gruppen die Expression von MMP13 gegenüber den dexamethasonfreien Bedingungen inhibiert. Dieser Unterschied zwischen der An- oder Abwesenheit von Dexamethason war am stärksten in den TGF- β -haltigen Gruppen ausgeprägt. Folglich reguliert das Glukokortikoid Dexamethason die Genexpression von MMP13, während die Genexpression von Kollagen 1 nur durch den Wachstumsfaktor BMP2 beeinflusst wird.

Abbildung 7: Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion von MMP13 und Col1 ohne und mit Zugabe von Dexamethason.

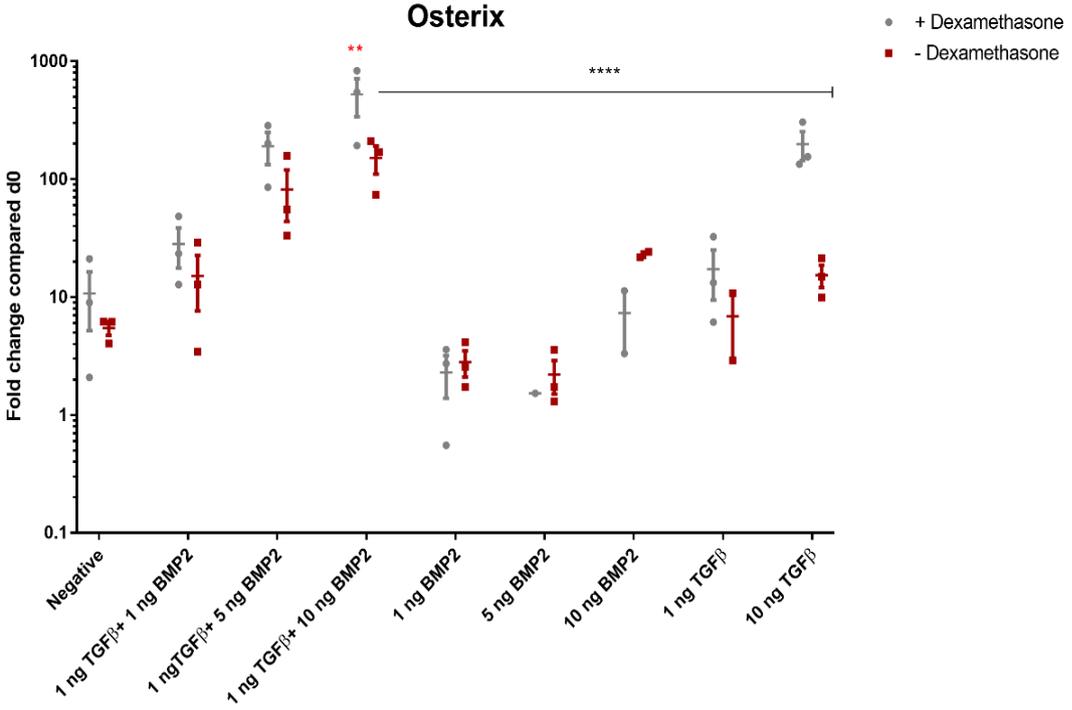


3.1.5 Einfluss von Dexamethason auf die Genexpression von Osterix in Kombination mit dem Wachstumsfaktor TGF- β

Das Gen Osterix (SP7) ist ein Gen, welches für die Differenzierung von Osteoblasten essentiell ist. Um die Möglichkeit einer osteochondralen Differenzierung während der Zelldifferenzierung abzuschätzen, der den Charakter einer stabilen chondrogenen Differenzierung abschwächt, wird dieses Gen als osteogener Marker untersucht und verwendet.

Unter der alleinigen Anwendung des Wachstumsfaktors TGF- β konnte eine Zunahme von SP7 beobachtet werden. Die Genexpression stieg dabei insbesondere bei einer Konzentration von 10ng TGF- β unter Zugabe von Dexamethason an, während im dexamethasonfreien Medium oder bei der niedrigeren Konzentration von TGF- β (1ng), nur eine geringe Veränderung der Konzentration dieses Markers beobachtet werden konnte. Interessanterweise zeigten diejenigen Zellen, die nur dem Wachstumsfaktor BMP2 in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt waren, nur einen geringen Anstieg der Genexpression von SP7, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Dexamethason. Bei der Kombination von steigenden Konzentrationen von BMP2 (1,5,10ng) mit 1ng TGF- β konnte jedoch eine dosisabhängige Erhöhung der Genexpression von SP7 festgestellt werden. Diese dosisabhängige Erhöhung war in den dexamethasonhaltigen Medien in allen Konzentrationen von BMP2 (1,5,10ng) gegenüber den dexamethasonfreien Medien ausgeprägter. Demzufolge scheint Dexamethason unter diesen Bedingungen einen osteogenen oder hypertrophen Phänotyp zu induzieren.

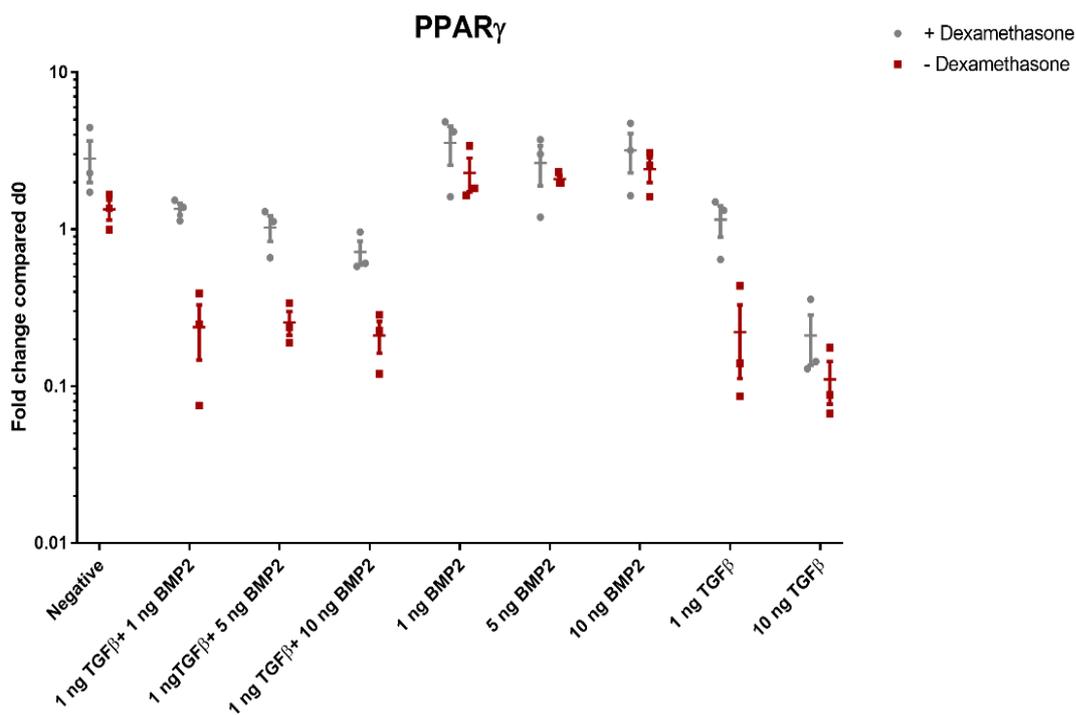
Abbildung 8: Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 auf die mRNA-Produktion von Osterix ohne und mit Zugabe von Dexamethason.



3.1.6 Regulation des Gens PPRy durch TGF-β

PPRy wird als Marker für eine mögliche adipogene Differenzierung synovialer Stammzellen verwendet. Es ist ein Gen, das für ein Mitglied der Peroxisom-Proliferator-Activated-Rezeptor (PPAR)-Unterfamilie der Kernrezeptoren kodiert, und einer der Hauptregulatoren der Adipozyten-Differenzierung. Die Anwendung des Wachstumsfaktors BMP2 in unterschiedlichen Konzentrationen (1,5,10ng) hatte keinen Einfluss auf die PPRy-Genexpression, unabhängig von der Anwesenheit von Dexamethason im Medium. Bei alleinigem Einsatz des Wachstumsfaktors TGF-β konnte sowohl bei einer geringen (1ng) als auch höheren Konzentration (10ng) eine Verringerung der Genexpression von PPRy beobachtet werden. Diese Erniedrigung war insbesondere bei Abwesenheit von Dexamethason festzustellen. Auch bei Kombination von 1ng TGF-β mit steigender Konzentration von BMP2 (1,5,10ng) verringerte sich das mRNA-Level von PPRy, ebenfalls stärker ausgeprägt in dexamethasonfreien Medien.

Abbildung 9: Einfluss der Wachstumsfaktoren TGF-β und BMP2 auf die mRNA-Produktion von PPRy ohne und mit Zugabe von Dexamethason.



3.2 Biochemische Analyse

3.2.1 Einfluss von TGF- β und BMP2 auf den zellulären Glykosaminoglykangehalt

Bei einer alleinigen Anwendung des Wachstumsfaktors BMP2 zeigte sich bei einer geringen Konzentration von 1ng kein wesentlicher Anstieg der Glykosaminoglykan (GAG)-Konzentration im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe, in der keine Wachstumsfaktoren anwesend waren. Erst bei höheren Konzentrationen von 5ng und 10ng BMP2 kam es zu einer deutlichen Zunahme des GAG-Gehaltes der Zellpellets.

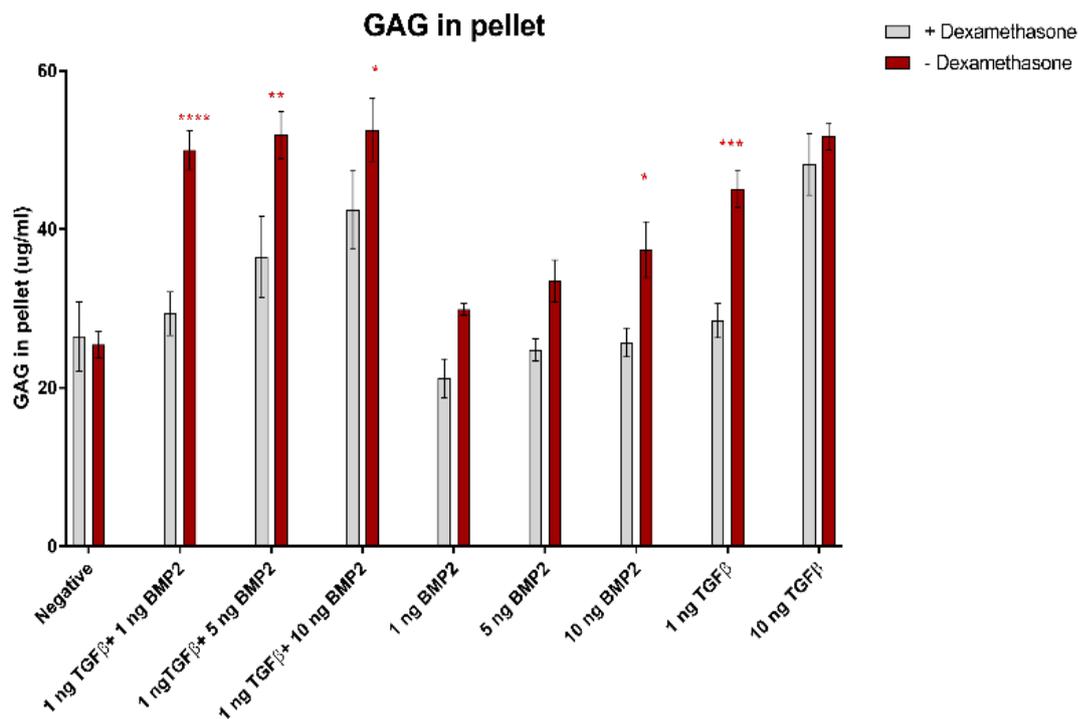
Dieser Zunahme war jedoch nur erkennbar, wenn Dexamethason im Medium der 21 tägigen Zelldifferenzierung nicht anwesend war. Befand sich das Glukokortikoid im Medium, konnte kein Anstieg des GAG-Gehaltes, verglichen mit der negativen Kontrollgruppe, beobachtet werden.

Wurde lediglich der Wachstumsfaktor TGF- β in einer geringen Konzentration von 1ng verwendet, zeigte sich ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Anwesenheit von Dexamethason. Wurde dem Medium zur Zelldifferenzierung kein Dexamethason zugefügt, konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im GAG-Gehalt der Pellets beobachtet werden. War dagegen kein Dexamethason anwesend, konnte selbst im Vergleich zur negativen Kontrollgruppe kein markanter Unterschied im GAG-Gehalt beobachtet werden.

Bei Kombination der beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β kam es zu einem synergistischen Effekt auf den GAG-Gehalt der Zellpellets. Auch in dieser kombinierten Anwendung der Wachstumsfaktoren ergab sich ein Unterschied bei der Zelldifferenzierung hinsichtlich der Verwendung von Dexamethason. In allen Konzentrationen von BMP2 in Kombination mit 1ng TGF- β war ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des zellulären Glykosaminoglykangehalts ersichtlich. In allen Gruppen ohne das Glukokortikoid Dexamethason war ein signifikanter Anstieg des GAG-Gehaltes zu beobachten.

Interessanterweise war dieser Unterschied des zellulären Glykosaminoglykangehalts statistisch gesehen am stärksten ausgeprägt bei der Gruppe, die lediglich eine geringe Konzentration von BMP2 in Kombination mit 1ng TGF- β enthielt. Je höher die Konzentration von BMP2 wurde, desto schwächer war auch der statistische Unterschied im GAG-Gehalt in Abhängigkeit von der An- bzw. Abwesenheit von Dexamethason. Dies bedeutet, dass TGF- β der hauptsächliche Wachstumsfaktor für die GAG-Synthese ist und auch am sensibelsten auf die Anwesenheit von Dexamethason reagiert.

Abbildung 10: Einfluss von TGF- β auf den zellulären Glykosaminoglykan-Gehalt.



3.2.2 Einfluss von Dexamethason auf den DNA-Gehalt

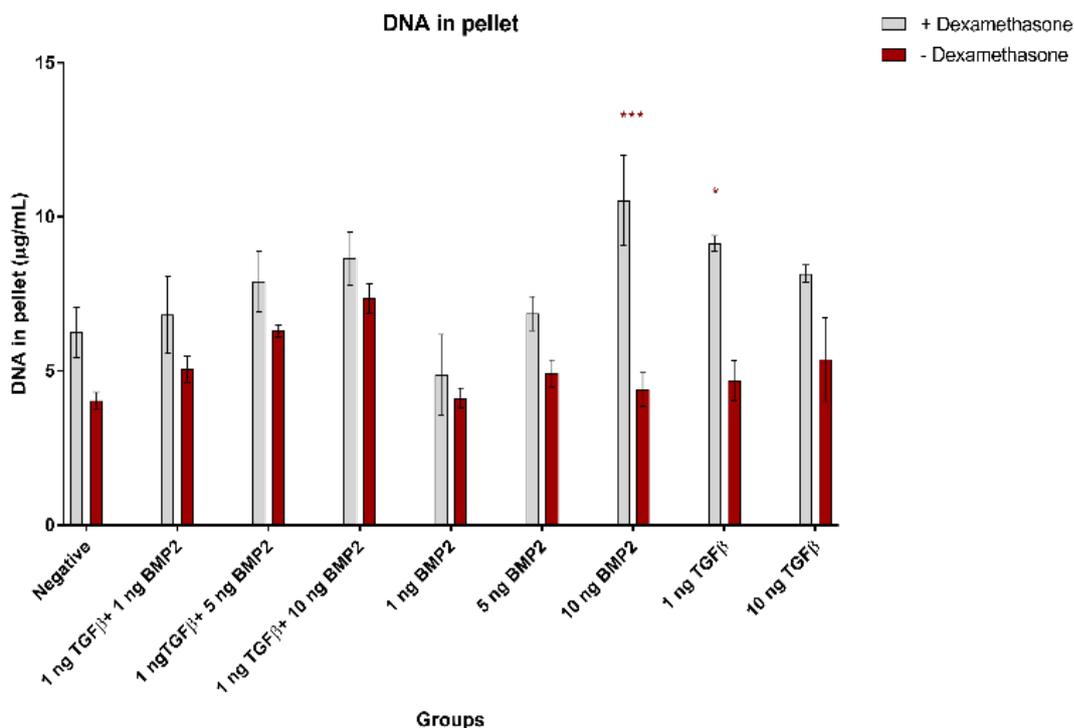
Bei Zusatz von BMP2 als alleinigem Wachstumsfaktor beeinflusste Dexamethason den DNA-Inhalt der Zellpellets insbesondere bei höheren BMP2-Konzentrationen. In jeder der Gruppen mit den drei unterschiedlichen Konzentrationen von 1,5 und 10ng BMP2 war ein Unterschied hinsichtlich der Zunahme des DNA-Gehaltes in den Zellpellets festzustellen. Je höher die Konzentration von BMP2 ist, desto größer scheint dieser Unterschied zu werden.

Ab einer Konzentration von 10ng BMP2 konnte ein sehr deutlicher und statistisch signifikanter Unterschied im DNA-Gehalt zwischen jener Gruppe, die Dexamethason im Medium hatte und der Gruppe ohne das Glukokortikoid ermittelt werden. Auch war zu beobachten, dass es bei Weglassen von Dexamethason in allen drei unterschiedlichen Konzentrationsgruppen zu keinem deutlichen Anstieg des DNA-Gehaltes der Zellen kam. Erst mit Zugabe von Dexamethason konnte ein kontinuierlicher Anstieg mit zunehmender Konzentration von BMP2 beobachtet werden. Zwischen den Konzentrationen von 5 und 10ng BMP2 war dieser Anstieg besonders deutlich.

Sowohl bei einer Konzentration von 1ng als auch von 10ng des Wachstumsfaktors TGF- β als einzigem Wachstumsfaktor konnte ein Unterschied hinsichtlich der Anwendung von Dexamethason in der Auswirkung auf die Zellproliferation beobachtet werden. So nahm die

Zellzahl, also der DNA-Gehalt in den Pellets, zu, wenn Dexamethason im Differenzierungsmedium enthalten war. Bei einer geringen Konzentration von nur 1ng TGF- β war dieser Unterschied schwach signifikant. Wurden die beiden Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 kombiniert verwendet, konnte ein kontinuierlicher Anstieg des DNA-Gehaltes in den Zellpellets sowohl mit als auch ohne Zugabe von Dexamethason beobachtet werden. Dabei war der DNA-Gehalt in allen Gruppen, die das Glukokortikoid Dexamethason im Differenzierungsmedium enthielten, höher als in den Gruppen ohne Dexamethason. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Abbildung 11: Einfluss von Dexamethason auf den DNA-Gehalt.



3.2.3 Einfluss von Dexamethason auf das Verhältnis von Glykosaminoglykan und DNA-Gehalt

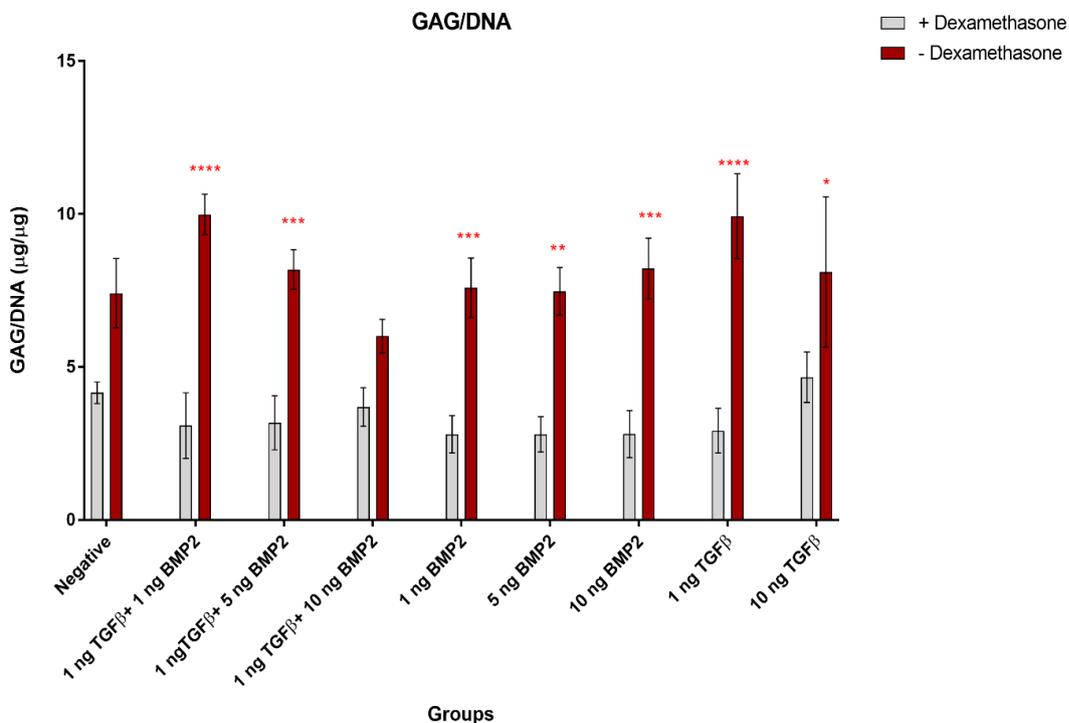
Bei alleiniger Anwendung des Wachstumsfaktors BMP2 konnte in allen drei Gruppen mit den unterschiedlichen Konzentrationen von 1,5 und 10ng ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Verwendung von Dexamethason im GAG/DNA-Verhältnis beobachtet werden. Ein Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander ergab sowohl mit als auch ohne Dexamethason in allen Konzentrationen ungefähr das gleiche Verhältnis von GAG/DNA, unabhängig davon, ob die BMP2-Konzentration von 1ng auf das 10fache gesteigert wurde.

Wurde als Wachstumsfaktor nur TGF- β im Differenzierungsmedium eingesetzt, konnte in beiden Konzentrationen, sowohl in der niedrigen von 1ng TGF- β als auch in der höheren von

10ng TGF- β ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Verwendung des Glukokortikoids Dexamethason im GAG/DNA-Verhältnis festgestellt werden. Dabei schien der Einfluss des Dexamethasons auf die niedrige Konzentration von TGF- β größer zu sein als auf die höhere Konzentration. Interessanterweise war auch das Verhältnis GAG/DNA höher in der Gruppe mit der niedrigen Konzentration dieses Wachstumsfaktors als in der Gruppe mit der höheren Konzentration.

In allen drei Gruppen, in denen die beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β kombiniert wurden, zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, die Dexamethason im Differenzierungsmedium enthalten hatten oder nicht. Dabei war in allen drei Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied in jenen Gruppen zu beobachten, die kein Dexamethason im Medium enthalten hatten. Dieser Unterschied wurde mit steigender Konzentration von BMP2 kleiner. Ab einer Konzentration von 10ng BMP2 in Kombination mit 1ng TGF- β war kein statistisch signifikanter Unterschied mehr festzustellen. Enthielten die Kombinationsgruppen Dexamethason, konnte zwischen den drei Gruppen kein offensichtlicher Unterschied für das GAG/DNA Verhältnis beobachtet werden. Lediglich wenn dieses nicht im Differenzierungsmedium verwendet wurde, wurde das GAG/DNA Verhältnis mit steigender Konzentration von BMP2 kleiner.

Abbildung 12: Einfluss von Dexamethason auf das Verhältnis GAG/DNA.



3.2.4 Einfluss der Kombination von BMP2 und TGF- β auf die Synthese von Glykosaminoglykanen

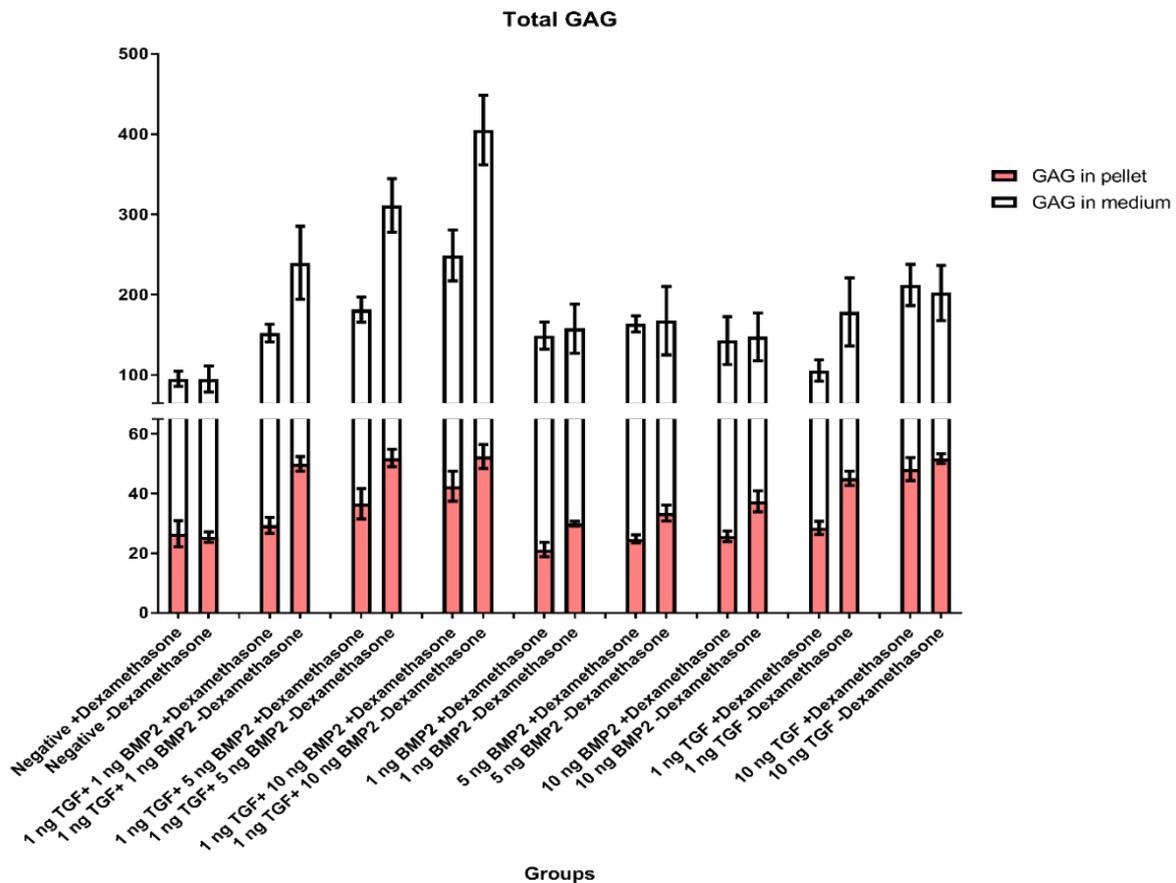
In den verschiedenen Gruppen, die als Wachstumsfaktor lediglich BMP2 im Differenzierungsmedium enthielten, war keinen nennenswerter Unterschied hinsichtlich des totalen GAG-Gehaltes festzustellen, weder zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen des Wachstumsfaktors noch in Abhängigkeit davon, ob sich Dexamethason im Medium befand oder nicht.

Bei einer geringen Konzentration von 1ng TGF- β zeigten sich Unterschiede hinsichtlich des totalen GAGs. Wurde das Glukokortikoid Dexamethason nicht im Differenzierungsmedium verwendet, konnte eine Erhöhung des totalen GAGs beobachtet werden. Unter der höheren Konzentration von 10ng TGF- β ergab sich kein offensichtlicher Unterschied in der totalen Menge des GAGs hinsichtlich der Verwendung von Dexamethason.

Wurden die beiden Wachstumsfaktoren kombiniert, zeigte sich eine Erhöhung des totalen GAGs mit steigender Konzentration des Wachstumsfaktors BMP2. Dabei war zu beobachten, dass in allen Kombinationsgruppen das totale GAG in jenen Gruppen höher ist, die kein Dexamethason im Medium enthalten hatten. Ohne Dexamethason wurde also insgesamt mehr GAG gebildet, dieses wurde jedoch auch vermehrt von den Zellpellets abgegeben, ohne dieses im Zellpellet zu halten. Der gesamte GAG-Gehalt besteht aus dem GAG in den Zellen und dem GAG im Medium nach 21 tägiger Zelldifferenzierung. Diese beiden Werte wurden addiert.

Die Kombination aus den beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β bewirkte die größte Synthese von Glykosaminoglykanen sowohl in den Zellen als auch im Medium.

Abbildung 13: Einfluss von Dexamethason auf den Gehalt an Gesamt-GAG.



3.3 Histologische Analyse

3.3.1 Makroskopische Analyse

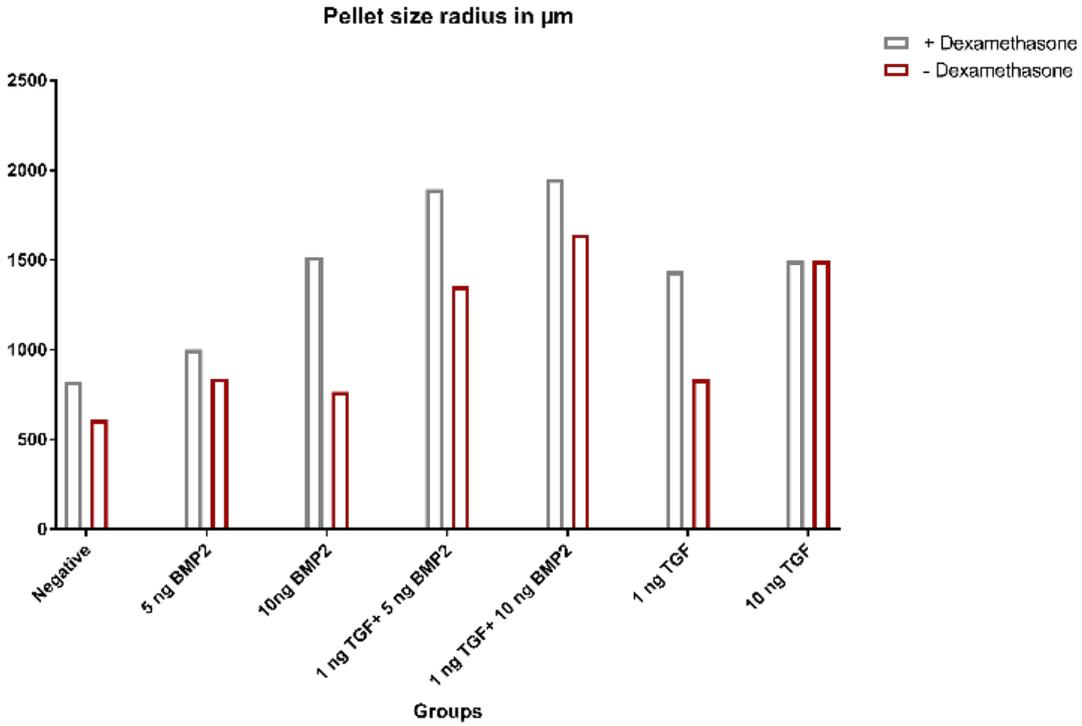
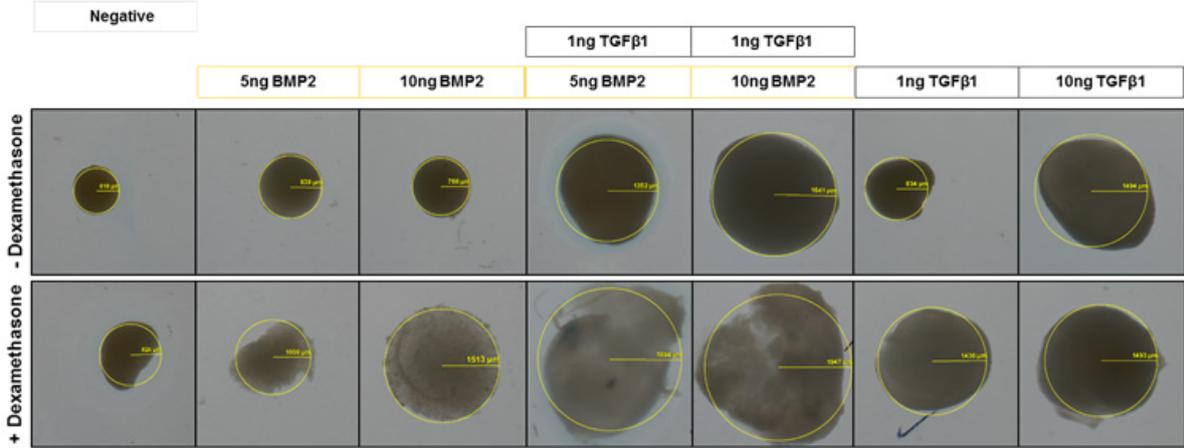
Der Wachstumsfaktor BMP2 moduliert die Größe der Zellpellets in der Anwesenheit von Dexamethason. Das Glukokortikoid Dexamethason hatte einen Einfluss auf die makroskopische Beschaffenheit der Zellpellets, welche einer 21 tägigen Zelldifferenzierung ausgesetzt waren. Sowohl bei der alleinigen Anwesenheit der Wachstumsfaktoren BMP2 und 1ng TGF- β als auch unter Kombination der beiden konnte eine Zunahme der Zellgröße und der Dichte sowie eine Veränderung der Zellstruktur beobachtet werden.

Auch bei der negativen Kontrollgruppe, welche keine Wachstumsfaktoren im Medium der Zelldifferenzierung hatte, zeigte sich bei der Anwesenheit von Dexamethason ein Unterschied in der Zellgröße und der Struktur der Zellpellets. Bei der Anwendung von 10ng TGF- β war weder ein Unterschied in der Zellgröße noch in der Zellstruktur und Dichte festzustellen. Wurde der Wachstumsfaktor BMP2 in unterschiedlichen Konzentrationen in Kombination mit 1 ng TGF- β eingesetzt, war ein synergistischer Effekt zu erkennen. Dieser Effekt war sowohl bei An- als auch bei Abwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason zu beobachten. Der synergistische Effekt war bei Anwesenheit von Dexamethason deutlicher ausgeprägt. Die

Zellgröße nahm zu, und die Kontur der Oberfläche der Zellpellets war nicht so glatt wie bei Abwesenheit von Dexamethason. Bei Zugabe des Glukokortikoids schienen die Zellpellets bei weitem inhomogener zu sein, sogar ein wenig zerstört, was den Anschein einer hypertrophischen Zellveränderung hatte.

Die makroskopische Analyse der Größe der Zellpellets erfolgte nach 21 Tagen unter dem Einfluss von Dexamethason und den beiden Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 alleine und in Kombination. Die synovialen Stammzellen wurden 21 Tage mit 10ng TGF- β (positive Kontrollgruppe), keinem Wachstumsfaktor (negative Kontrollgruppe), einer geringen Konzentration von TGF- β (1ng TGF- β) oder mit ansteigenden Konzentrationen von BMP2 alleine (1ng BMP2, 5ng BMP2, 10ng BMP2) oder in Kombination mit 1ng TGF- β (1 ng TGF- β + 1ng BMP2, 1 ng TGF- β +5 ng BMP2 und 1 ng TGF- β +10 ng BMP2) versetzt. Die Abb. 14 zeigt repräsentative Beispiele für 4 separate Experimente mit 4 verschiedenen Donoren. Die Radiusgröße wird in μm angezeigt.

Abbildung 14: Makroskopische Analyse der Größe der Zellpellets nach 21 Tagen unter Dexamethason, TGF-β und BMP2 (alleine und in Kombination).



3.3.2 Safranin-O-Färbung

Die Safranin-O-Fast-Green-Färbung bestätigte den Einfluss von Dexamethason während der chondrogenen Differenzierung humaner synovialer Stammzellen: Um die ermittelten Daten auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene hinsichtlich der chondrogenen Marker wie Collagen 2 und Aggrekan sowie des Glykosaminoglykangehaltes auf makroskopischer Ebene zu überprüfen, wurde eine Safranin-O-Fast-Green-Färbung durchgeführt. Damit sollte festgestellt werden, ob die Gene und Glykosaminoglykane auch nach 21-tägiger Zelldifferenzierung mit den beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β allein oder in Kombination makroskopisch in den Zellpellets nachweisbar waren.

Bei alleiniger Verwendung des Wachstumsfaktors BMP2 im Differenzierungsmedium zeigte sich weder bei An- noch bei Abwesenheit von Dexamethason eine positive Färbung. Die Zellpellets wiesen keine Zeichen einer violetten oder roten Färbung auf, was auf eine Anreicherung von Glykosaminoglykanen auf makroskopischer Ebene hindeuten würde.

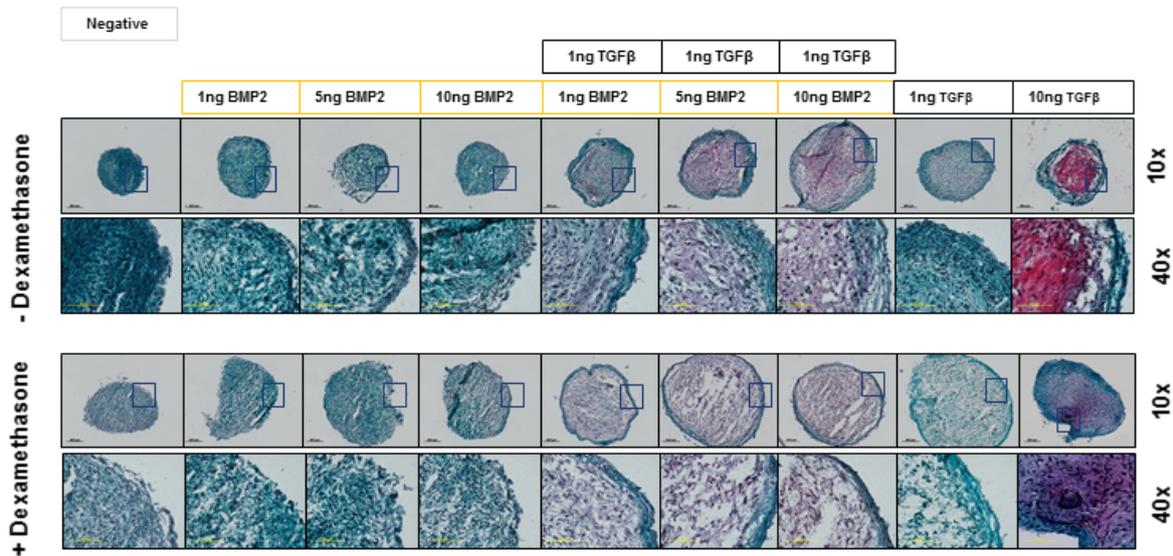
Wurde der Wachstumsfaktor TGF- β nur in einer geringen Konzentration von 1ng eingesetzt, konnte ebenfalls weder bei An- noch bei Abwesenheit von Dexamethason eine positive Färbung beobachtet werden. Wurde hingegen dieser Wachstumsfaktor in einer Konzentration von 10ng verwendet, konnte bei der An- als auch Abwesenheit von Dexamethason eine positive Safranin-Färbung festgestellt werden. Diese fiel deutlich positiver aus, wenn das Glukokortikoid Dexamethason nicht im Medium der Zelldifferenzierung enthalten war.

Wurde der Wachstumsfaktor BMP2 in den Konzentrationen von 1,5 oder 10ng mit einer geringen Konzentration von 1ng TGF- β kombiniert, konnten positive Safranin-O-Farbreaktionen beobachtet werden. Selbst bei einer geringen Konzentration von 1ng BMP2 mit 1ng TGF- β traten erste schwache violette Farbveränderungen auf. Diese Farbveränderung wurde mit steigender Konzentration des Wachstumsfaktors BMP2 deutlicher und intensiver. Bei der mikroskopischen Darstellung der Zellpellets konnten keine deutlichen Unterschiede in der Farbe oder Farbtintensität zwischen der An- oder Abwesenheit von Dexamethason festgestellt werden.

Hierzu wurden die synovialen Stammzellen 21 Tage mit 10ng TGF- β (positive Kontrollgruppe), keinem Wachstumsfaktor (negative Kontrollgruppe), einer geringen Konzentration von TGF- β (1ng TGF- β), ansteigenden Konzentration von BMP2 alleine (1ng BMP2, 5ng BMP2, 10ng BMP2) oder in Kombination mit 1ng TGF- β (1 ng TGF- β +1ng BMP2, 1 ng TGF- β +5 ng BMP2 und 1 ng TGF- β +10 ng BMP2) versetzt. Die Intensität der Safranin-O-Fast-Green-Färbung ist direkt proportional zum Proteoglykangehalt der Zellpellets. Grüne Strukturen werden durch die

Gegenfärbung angezeigt. Die Zellpellets sind repräsentativ für 4 verschiedene Experimente von 4 verschiedenen Donoren.

Abbildung 15: Safranin-O-Fast-Green-Färbung zur Detektion von Proteoglykanen auf synovialen Stammzellen unter dem Einfluss von Dexamethason und TGF- β und BMP2 (Maßstab schwarz für 10x Objektiv=200 μ m, Maßstab für 40x Objektiv= 1000 μ m).



3.3.3 Von-Kossa-Färbung

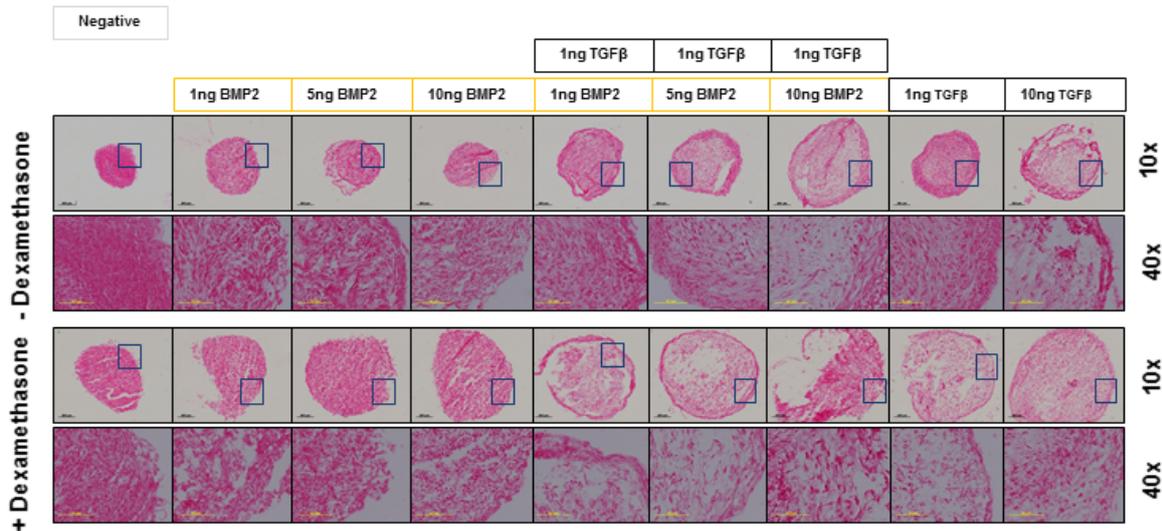
Um die Kalzifizierung und Mineralisation zu überprüfen, wurde an den Zellpellets eine Von-Kossa-Färbung durchgeführt.

Es konnte weder eine Mineralisation noch eine Kalzifizierung festgestellt werden, was als ein negatives Resultat gedeutet und gewertet werden kann. Die Zellpellets der synovialen Stammzellen wiesen nach einer 21-tägigen Zelldifferenzierung noch keine makroskopisch sichtbare Mineralisation auf, was als eine endochondrale Ossifikation gewertet werden könnte.

Selbst jene Gruppen, die Dexamethason im Zellmedium hatten und auf molekularbiologischer Ebene hypertrophe Marker vermehrt exprimiert hatten, zeigten auf makroskopischer Ebene keine Veränderung hinsichtlich der Kalzifizierung oder Mineralisation, die sich bei einer Von-Kossa-Färbung als Schwarzfärbung darstellen würde.

Hierzu wurden die synovialen Stammzellen 21 Tage mit 10ng TGF- β (positive Kontrollgruppe), keinem Wachstumsfaktor (negative Kontrollgruppe), einer geringen Konzentration von TGF- β (1ng TGF- β), in ansteigender Konzentration von BMP2 alleine (1ng BMP2, 5ng BMP2, 10ng BMP2) oder in Kombination mit 1ng TGF- β (1ng TGF- β + 1ng BMP2, 1ng TGF- β +5ng BMP2 und 1ng TGF- β +10ng BMP2) versetzt. Die Zellpellets sind repräsentativ für 4 verschiedene Experimente von 4 verschiedenen Donoren.

Abbildung 16: Von-Kossa-Färbung zur Ermittlung der Mineralisation und Kalzifizierung der synovialen Stammzellen unter Dexamethason und TGF- β und BMP2 (Maßstab schwarz für 10x Objektiv=200 μ m, Maßstab 40x Objektiv= 1000 μ m).



3.3.4 Immunfluoreszenz

Die immunhistochemische Anti-Kollagen-II-Färbung bestätigt den Dexamethason-Einfluss während der chondrogenen Differenzierung synovialer Stammzellen: Sowohl bei der An- als auch Abwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason während der 21-tägigen Zelldifferenzierung zeigte sich bei alleiniger Verwendung des Wachstumsfaktors BMP2 keine positive Reaktion auf den Kollagen-2-Antikörper. Somit konnte auf makroskopischer Ebene für dieses Verfahren keine positive Reaktion für Kollagen 2 in diesen Gruppen festgestellt werden.

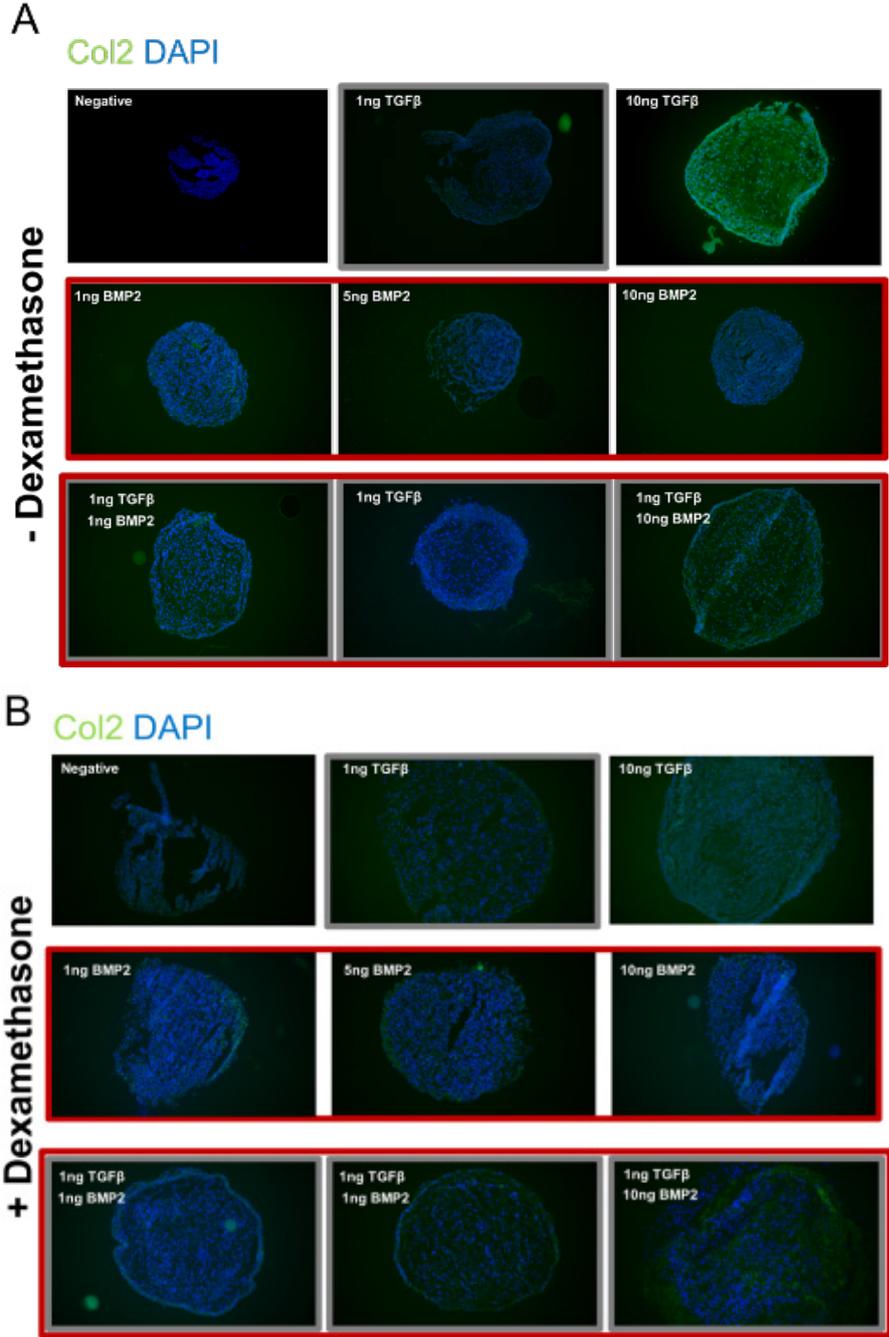
Bei einer Konzentration von nur 1ng TGF- β zeigte sich unter An- als auch Abwesenheit von Dexamethason keine positive Reaktion für den Kollagen-2-Antikörper. Erst ab einer höheren Konzentration von 10ng TGF- β trat eine deutlich positive Reaktion auf diesen Antikörper auf. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion war bei der Abwesenheit von Dexamethason stärker.

Unter der Kombination der beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β konnte bei der höheren Konzentration von 10ng BMP2 in Kombination mit 1ng TGF- β eine positive Reaktion für den Kollagen-2-Antikörper festgestellt werden.

Wie schon bei der alleinigen Verwendung von TGF- β war bei einer Abwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason eine stärkere Antigen-Antikörper-Reaktion zu beobachten. Bei Kombination des Wachstumsfaktors BMP2 in einer Konzentration von 1ng und 5ng in Kombination mit 1ng TGF- β konnte keine oder lediglich eine schwache Antigen-Antikörper-Reaktion für Kollagen 2 verzeichnet werden.

Hierzu wurden die synovialen Stammzellen 21 Tage mit 10ng TGF- β (positive Kontrollgruppe), keinem Wachstumsfaktor (negative Kontrollgruppe), einer geringen Konzentration von TGF- β (1ng TGF- β), in ansteigenden Konzentration von BMP2 alleine (1ng BMP2, 5ng BMP2, 10ng BMP2) oder in Kombination mit 1ng TGF- β (1ng TGF- β + 1ng BMP2, 1ng TGF- β +5ng BMP2 und 1ng TGF- β +10ng BMP2) versetzt. Die Zellpellets sind repräsentativ für 4 verschiedene Experimente von 4 verschiedenen Donoren.

Abbildung 17: Immunfluoreszenz zur Ermittlung der Kollagen-2- / DAPI-Reaktion auf synoviale Stammzellen unter Dexamethason und BMP2 und TGF- β) Maßstab schwarz für 10x Objektiv=200 μ m, Maßstab für 40x Objektiv= 1000 μ m).



4 Diskussion

Die Anwendung mesenchymaler Stammzellen stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, die Geweberegeneration in schwer zu ersetzenden Geweben wie Knorpel anzuregen (Kalamegam et al. 2018; Perera et al. 2012; Dhinsa und Adesida 2012; Murphy et al. 2018; Kubosch et al. 2018).

Jüngste Studien haben die Rolle des epigenetischen Gedächtnisses bei der MSC-Differenzierung hervorgehoben (Sacchetti et al. 2016). Dies legt nahe, dass Zellen aus verschiedenen Quellen möglicherweise Differenzierungsmedien benötigen, die für jede Zellquelle optimiert werden müssen. Wie die beiden Forscher Shinati und Hunziker (Shintani und Hunziker 2011) bereits in ihrer Veröffentlichung im Jahre 2011 zeigen konnten, besteht ein Unterschied hinsichtlich der Verwendung von Dexamethason, beeinflusst durch die Mikroumgebung, die Gewebeherkunft und die beteiligten Wachstumsfaktoren.

Das klassische chondrogene Differenzierungsmedium wurde für aus dem Knochenmark stammende MSCs optimiert (Johnstone et al. 1998).

Es wurde bereits gezeigt, dass das chondrogene Potential von mesenchymalen Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs optimiert werden kann.

So kann das chondrogene Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen in vitro durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren erhöht werden.

Auch die Sauerstoffkonzentration oder mechanische Belastung können die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen unterschiedlicher Herkunft beeinflussen (Tang et al. 2015; Johnstone et al. 2013; Graceffa et al. 2019; Fahy et al. 2018).

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie synoviale Stammzellen auf die Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 reagieren und welche Auswirkungen die Kombination mit Dexamethason in vitro hat.

Dexamethason ist ein gemeinsamer Faktor, der in allen Differenzierungsmedien vorhanden ist, unabhängig von der Induktion in Richtung Chondrogenese, Adipogenese oder Osteogenese (Scott et al. 2011; Hanna et al. 2018; Johnstone et al. 1998).

Dies lässt vermuten, dass die Verwendung von Dexamethason kein entscheidender Faktor für eine bestimmte Differenzierungslinie ist, sondern ein Modulator während des Entwicklungsverlaufes mesenchymaler Stammzellen.

Bisherige Forschungsarbeiten konnten darlegen, dass sowohl TGF- β als auch BMP2 die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen induzieren und fördern können.

So kann die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch Hinzugabe des Wachstumsfaktors BMP2 induziert werden (Park et al. 2005; Zhou et al. 2016; Caron et al. 2012; Schmitt et al. 2003; Nöth et al. 2007).

Zahlreiche wissenschaftliche Publikationen zeigten, dass der Wachstumsfaktor TGF- β bei mesenchymalen Stammzellen ebenfalls eine chondrogene Differenzierung induzieren und fördern kann (Johnstone et al. 1998; Xia et al. 2017a; Jiang et al. 2017; Nöth et al. 2007; Wang et al. 2014b; Oka et al. 2007; Murphy et al. 2015; Chen et al. 2019).

Bei der Kombination von TGF- β und BMP2 ist ein synergistischer Effekt hinsichtlich der chondrogenen Differenzierung zu beobachten.

Frühere Studien verwendeten allerdings weit höhere Konzentrationen der beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β als sie in dieser Arbeit eingesetzt wurden (Shen et al. 2009; Shintani et al. 2013; Mehlhorn et al. 2007; Keller et al. 2011; Toh et al. 2005; Legendre et al. 2017; Branly et al. 2017).

Als Maß für die chondrogene Differenzierung wurden die Marker ACAN, COL2A1 und SOX9 verwendet. Dies sind zentrale Proteine, die auf eine Differenzierung der Stammzellen zu Chondrozyten hinweisen (Yi et al. 2018; Mardani et al. 2013; Park et al. 2011; Watanabe et al. 1998; Kiani et al. 2002).

Während der induzierten chondrogenen Differenzierung wurden ACAN, COL2 und SOX9 in Gegenwart der herkömmlichen Konzentration von 10ng TGF- β hochreguliert.

Bei einer niedrigen Konzentration von 1ng TGF- β war keine deutliche Veränderung hinsichtlich der chondrogenen Marker ACAN, COL2 und SOX9 festzustellen. Bei der alleinigen Verwendung des Wachstumsfaktors BMP2 (1,5,10 ng/ml) konnte jedoch wieder eine Hochregulierung entsprechender Gene beobachtet werden. Diese ist jedoch bei weitem nicht mit der des Wachstumsfaktors TGF- β (10ng/ml) vergleichbar. Bei der Kombination von BMP2 mit einer geringen Menge von 1ng TGF- β konnte die stärkste Hochregulierung der chondrogenen Marker festgestellt werden. Die Kombination von TGF- β 1 und BMP-2 führte daher zu einer verstärkten chondrogenen Differenzierung synovialer Stammzellen auf molekularer Ebene.

Bei Abwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason von 100 nM / ml bestand ein generell verbessertes chondrogenes Potential für die beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β alleine und in Kombination. Das mRNA-Level für Aggrekan, Kollagen 2 und SOX9 wurde

insbesondere von Dexamethason moduliert, wenn der Wachstumsfaktor BMP2 alleine im Medium verwendet wurde. Zu dieser Beobachtung kamen auch andere wissenschaftliche Studien (Shintani und Hunziker 2011; Park et al. 2005). Wenn der Wachstumsfaktor TGF- β (10 ng / ml TGF- β 1) alleine im Medium verwendet wurde, wurde die Genregulierung von Aggrekan, Kollagen 2 und SOX9 wenig bis gar nicht durch Dexamethason beeinflusst. Somit bestand bei Abwesenheit von 100 nM / ml Dexamethason ein verbessertes chondrogenes Potential speziell für die Gruppen mit BMP2 (1,5, 10 ng / ml BMP2) als alleinigem Wachstumsfaktor und in den TGF- β - / BMP2-Kombinationsgruppen.

Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR und der biochemischen Analysen wurden durch histologische Bewertung bestätigt.

So zeigten die histologischen Ergebnisse eine höhere Positivität für die GAG- und Typ II-Kollagenfärbung in Zellen, die nicht Dexamethason ausgesetzt waren.

Während bei einer alleinigen Verwendung des Wachstumsfaktors BMP2 in allen Konzentrationen keine positive Reaktion hinsichtlich der verschiedenen histologischen Analysen gezeigt wurde, konnte bei einer Kombination sowohl bei der Safranin-O-Fast-Green-Färbung als auch bei der Immunfluoreszenz-Färbung eine positive Reaktion beobachtet werden.

Diese fiel allerdings schwächer aus, als wenn der Wachstumsfaktor TGF- β alleine in der standardmäßigen Konzentration (10 ng / ml TGF- β) im Zelldifferenzierungsmedium verwendet wurde.

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Befunden überein, bei denen eine chondrogene Differenzierung von SDSCs in einer Co-Kultur von SDSC und Chondrozyten gezeigt werden konnte. Die Co-Kultur menschlicher synovialer mesenchymaler Stammzellen mit Chondrozyten führt zur Selbstorganisation, chondrogenen Differenzierung und Sekretion von TGF- β (Kubosch et al. 2016).

Frühere Studien haben auch die negative Wirkung von 100 nM / ml Dexamethason auf die chondrogene Differenzierung von SDSC gezeigt (Chijimatsu et al. 2018). Dieselbe Arbeit zeigt, dass 10 nM / ml Dexamethason auch dann die chondrogene Differenzierung hemmen, wenn nur BMP-2 verwendet wurde, verglichen mit der alleinigen Verwendung von TGF- β (Chijimatsu et al. 2018).

Die Verwendung von Dexamethason führt zu einer erhöhten Expression des hypertrophen Markers COL10. Dieser Marker wird mit der hypertrophen Differenzierung in Verbindung gebracht (Kielty et al. 1985; He et al. 2014; Mark et al. 1992; He et al. 2018; Yang et al. 2014).

Auf der anderen Seite führt die Abwesenheit des Glukokortikoids dazu, dass die COL2-Expression erhöht wird, was zu einem höheren COL2 / COL10-Verhältnis führt. Dieses Resultat deutet auf einen weniger hypertrophen Phänotyp hin. Dieses sogenannte hypertrophe Verhalten (hoher Anteil an Kollagen 10 und niedriger Anteil an Kollagen 2) ist mit der Entwicklung eines temporären Knorpels verbunden, der sich in Knochen umwandelt (Yang et al. 2014; Hinton et al. 2017; Zhou et al. 2014; Li und Dong 2016). Somit wird ein höheres COL2 / COL10-Verhältnis als vorteilhaft für einen stabileren Knorpel angesehen.

MMP13 gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen, die beim Abbau von extrazellulären Matrixproteinen einschließlich Kollagen eine Rolle spielen (Stamenkovic 2003).

MMP13 scheint während degenerativen Prozessen des Knorpels und bei Arthrose beteiligt zu sein (Henkelmann et al. 2015; Wang et al. 2013; Li et al. 2011; Inada et al. 2004; Mazur et al. 2019; Jüngel et al. 2010).

Dexamethason verringerte die MMP13-Expression in allen Gruppen dieses Projektes.

MMP13 wurde insbesondere bei Kombination der beiden Wachstumsfaktoren verringert.

Die antiinflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden ist bekannt und in Veröffentlichungen beschrieben (Richardson und Dodge 2003; Garvican et al. 2010; Busschers et al. 2010; Boileau et al. 2005).

MMP13 kann als ein hypertropher Marker interpretiert werden (D'Angelo et al. 2000; Johansson et al. 1997; van der Kraan und van den Berg 2012).

Es wird angenommen, dass MMP13 an der Übergangsphase von Zellen zu einem osteochondralen Schicksal beteiligt ist (Inada et al. 2004).

Anhand der Beobachtung, dass Dexamethason das mRNA-Level für MMP13 reduziert, könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass die Zugabe von Dexamethason für die chondrogene Differenzierung synovialer Stammzellen sinnvoll wäre.

Die Bedeutung für MMP13 in diesem Zusammenhang ist allerdings nicht eindeutig.

MMP13 kann in diesem Fall kein überzeugender hypertropher Marker sein, da in den Gruppen ohne Dexamethason die hypertrophen Marker Kollagen 10 und RUNX2 weniger exprimiert wurden.

Bei der makroskopischen Analyse zeigten die Gruppen ohne Dexamethason ebenfalls einen stabileren chondrogenen Phänotyp.

Aus diesen Rückschlüssen kann das Ergebnis für MMP13 so gedeutet werden, dass jener Marker eine Art „Matrix-Zerstörungsfaktor“ ist.

Damit kann bestätigt werden, dass das Glukokortikoid Dexamethason MMP13 antiinflammatorisch reduziert und eine Art oxidativen Stress gegenüber den Zellen vermindert.

Es ist festzustellen, dass die GAG-Produktion in Zellen, die nicht mit Dexamethason behandelt wurden, signifikant höher war als in solchen, die mit Dexamethason behandelt wurden.

Sowohl die GAG-Retention innerhalb des Zellpellets als auch die GAG-Freisetzung in das Medium waren höher, wenn Dexamethason fehlte, jedoch war in der Kombinationsgruppe von BMP2 und TGF- β eine geringere Retention von GAG vorhanden.

Der Einfluss von Dexamethason, BMP-2, TGF- β und deren Kombination auf andere Differenzierungswege wurde ebenfalls untersucht (Caron et al. 2013).

Osterix (kodiert durch das SP7-Gen) ist zusammen mit RUNX2 ein Transkriptionsfaktor, der an der osteogenen Differenzierung beteiligt ist, und wird auch in BMSCs durch TGF- β hochreguliert. (Komori 2011; Glueck et al. 2015; Loebel et al. 2015). Diese Faktoren sind auch an der hypertrophen Differenzierung während der Chondrogenese beteiligt, sodass weitere Arbeiten durchgeführt werden müssten, um festzustellen, welcher Weg bevorzugt werden sollte. Dexamethason hat eine begrenzte Wirkung auf die SP7-Expression, die durch die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren stärker reguliert wurde (Kwon et al. 2013). Der Einfluss von TGF- β und BMP2 auf die adipogene Differenzierung wurde unter Verwendung von PPRy als Marker untersucht (Chawla et al. 1994; Sekiya et al. 2004). PPRy ist von den angewandten Bedingungen weitgehend unberührt. Es gibt jedoch eine Tendenz zu einer geringeren Expression, wenn Dexamethason fehlte und TGF- β vorhanden ist.

Mit dem vorliegenden Projekt wurden interessante und reproduzierbare Ergebnisse erzielt.

Die immunhistochemische Analyse konnte jedoch nicht eindeutig bewertet werden, da sie in vielen Fällen nicht optimal funktionierte und daher die Ergebnisse der Safranin-O-Färbung und der Immunfluoreszenzfärbung nicht widerspiegeln konnte.

Das Protokoll für die Immunhistochemie könnte hinsichtlich des Aufbaus und der einzelnen Arbeitsschritte und der verwendeten Substanzen variiert werden.

Dies könnte auch eine individuellere Anpassung an synoviale Stammzellen umfassen.

Unzureichendes Protein für Kollagen 2 während der Differenzierungsphase könnte ebenfalls eine mögliche Ursache für eine negative Reaktion sein.

Die Studie beschränkt sich auf die Auswertung von in vitro Versuchen und lässt somit noch keine unmittelbaren Rückschlüsse auf mögliche Ergebnisse im Rahmen von in vivo Studien zu.

Eine Erhöhung der Anzahl von Donoren könnte zudem zu einer erhöhten, statistischen Belastbarkeit der Ergebnisse führen, was es im Rahmen weiterer Untersuchungen zu verifizieren gilt.

Während die Differenzierungsphase der synovialen Stammzellen in dieser Studie 21 Tage beträgt, gilt es ferner zu untersuchen, wie sich die Zelldifferenzierung bei einer längeren oder kürzeren Differenzierungsphase verändert. Des Weiteren könnte eine veränderte Konzentration der einzelnen Wachstumsfaktoren und des Dexamethasons sowie der Zeitintervalle der Zugabe in das Differenzierungsmedium zu weiteren Erkenntnissen führen.

Die Kombination von BMP2 und TGF- β zeigte auf molekularer Ebene die höchste Genexpression für eine chondrogene Differenzierung.

Im Gegensatz dazu wurde die Proteinexpression für GAG und Kollagen 2 im Vergleich zur TGF- β -Gruppe (10 ng / ml) verringert.

Die Ursache für die synergistische Wirkung von BMP2 und TGF- β und der Einfluss von Dexamethason auf die chondrogene Differenzierung synovialer Stammzellen kann bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklärt werden.

Weiterführende Forschungsarbeiten müssten die genauen Signalwege ermitteln und analysieren.

Die Signalwege der beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β müssten detailliert mit allen Reaktionen während der chondrogenen Differenzierung erforscht werden.

Dabei könnten Rezeptoren als auch einzelne Moleküle oder Proteinkomplexe, mit denen die Wachstumsfaktoren interagieren, eine mögliche Lösung für den synergistischen Effekt und den Einfluss des Dexamethasons darstellen.

Die sogenannten SMAD-Moleküle könnten einen interessanten Ansatz für diese Fragestellung bieten (Kroon et al. 2017).

Eine Studie aus dem Jahr 2020 konnte bereits den Einfluss von Dexamethason auf die verschiedenen RNAs während der chondrogenen und osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark zeigen (Della Bella et al. 2020).

Dieser Ansatz, verschiedene RNAs während der chondrogenen Differenzierung synovialer Stammzellen zu erforschen, könnte auch dahingehend zu neuen Erkenntnissen führen, wie die beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und TGF- β sowie Dexamethason auf synoviale Stammzellen einzeln wirken.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob humane synoviale Stammzellen eine Zellquelle für das Knorpel Tissue Engineering sein können.

In dieser Arbeit wurde das chondrogene Differenzierungspotential synovialer Stammzellen in vitro als Zellpelletkultur näher untersucht. Dabei wurden insbesondere der Einfluss der beiden Wachstumsfaktoren TGF- β und BMP2 und des Glukokortikoids Dexamethason während der chondrogenen Differenzierung erforscht.

Die Untersuchung fand auf molekularer, histologischer und biochemischer Ebene statt.

Dabei wurden mit Hilfe der qPCR auf molekularer Ebene Gene untersucht, die für die Analyse der chondrogenen Differenzierung erforderlich sind. Mit der histologischen Analyse wurde die Proteinexpression auf makroskopischer Ebene bewertet. Die biochemische Analyse diente der Bestimmung der Konzentration des Glykosaminoglykans und der DNA in den Zellpellets.

Die Arbeit konnte aufzeigen, dass die chondrogene Differenzierung in Abwesenheit von Dexamethason zu einem stabileren chondrogenen Phänotyp führte, wenn SDSCs als Zellquelle verwendet wurden.

Daneben konnte festgestellt werden, dass die Kombination von BMP2 mit einer niedrigen Konzentration von TGF- β das beste chondrogene Differenzierungspotential für synoviale Stammzellen darstellt.

Basierend auf den Ergebnissen kann daher die Anwendung einer niedrigen TGF- β -Konzentration in Kombination mit BMP-2 vorgeschlagen werden, um eine chondrogene Differenzierung ohne die Verwendung von Dexamethason zu induzieren.

Durch bisherige Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass die mechanische Belastung die Produktion und Aktivierung von endogenem TGF- β 1 erhöht (Gardner et al. 2017b; Li et al. 2010).

Zukünftige klinische Strategien zur Regeneration von Knorpelgewebe könnte die Implantation von synovialen Stammzellen mit BMP-2 sein (Gautschi et al. 2007; Biase und Capanna 2005). Die Kombination mit der endogen gewonnenen TGF- β -Komponente, die durch mechanische Stimulation im Kniegelenk erzeugt wird, könnte ein vielversprechender Ansatz für das Knorpel Tissue Engineering darstellen. Dies könnte den Weg für die Untersuchung verschiedener Methoden zur Differenzierung von Synovialzellen ebnet, einer relevanten Zellquelle, die im Bereich der regenerativen Medizin für Patienten mit schweren Knorpelproblemen eingesetzt werden könnte.

Summary

BMP2 and TGF- β cooperate differently during synovial-derived stem-cell chondrogenesis in a dexamethasone-dependent manner

In this work this chondrogenic differentiation potential of synovial stem cells is examined in vitro as a cell pellet culture.

In particular, the two growth factors TGF- β and BMP2 and the glucocorticoid dexamethasone are examined during chondrogenic differentiation.

This investigation takes place on a molecular, histological and biochemical level.

The qPCR genes that are required for the analysis of chondrogenic differentiation are examined at the molecular level. Histological analysis analyzes and evaluates protein expression on a macroscopic level. The biochemical analysis is used to determine the concentration of the glycosamine content and DNA content in the cell pellets.

The work can show that chondrogenic differentiation in the absence of dexamethasone leads to a more stable chondrogenic phenotype when hSDSCs are used as a cell source.

Furthermore, it can be shown that the combination of BMP2 with a low concentration of TGF- β represents the best chondrogenic differentiation potential for synovial stem cells.

Based on the observed results, the use of a low TGF- β concentration in combination with BMP-2 can therefore be suggested to induce chondrogenic differentiation without the use of dexamethasone.

Previous research has shown that mechanical stress increases the production and activation of endogenous TGF- β . (Gardner et al. 2017a; Li et al. 2010)

Future clinical strategies for the regeneration of cartilage tissue could be the implantation of synovial stem cells with BMP-2 (Gautschi et al. 2007; Biase und Capanna 2005). The combination with the endogenously obtained TGF- β component, which is generated by mechanical stimulation in the knee joint, could represent a promising approach for cartilage tissue engineering.

This could pave the way for the study of different methods of differentiating synovial cells, a relevant cell source that could be used in regenerative medicine for patients with severe cartilage problems.

Literaturverzeichnis

- Aktories K, Forth W und Förstermann U (2005): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 9., völlig überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer – ISBN: 978-3-437-44490-6
- Armiento A R, Alini M und Stoddart M J (2019): Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? In: *Advanced drug delivery reviews*, 2019 Vol. 146, S. 289-305 – DOI: 10.1016/j.addr.2018.12.015
- Bari C de, Dell'Accio F, Tylzanowski P und Luyten F P (2001): Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. In: *Arthritis and rheumatism*, 44(8), S. 1928-1942 – DOI: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P
- Barry F P, Murphy J M, English K und Mahon B P (2005): Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft. In: *Stem cells and development*, 14(3), S. 252-265 – DOI: 10.1089/scd.2005.14.252
- Basoli V, Santaniello S, Cruciani S, Ginesu G C, Cossu M L und Delitala A P (2017): Melatonin and Vitamin D Interfere with the Adipogenic Fate of Adipose-Derived Stem Cells. In: *International journal of molecular sciences*, 18(5) – DOI: 10.3390/ijms18050981
- Beane O S und Darling E M (2012): Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. In: *Annals of biomedical engineering*, 40(10), S. 2079-2097 – DOI: 10.1007/s10439-012-0639-8
- Becker D E (2013): Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. In: *Anesthesia progress*, 60(1), S. 25-31, quiz 32 – DOI: 10.2344/0003-3006-60.1.25
- Bhosale A M und Richardson J B (2008): Articular cartilage: structure, injuries and review of management. In: *British medical bulletin*, 87, S. 77-95 – DOI: 10.1093/bmb/ldn025
- Bianco P, Robey P G und Simmons P J (2008): Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. In: *Cell stem cell*, 2(4), S. 313-319 – DOI: 10.1016/j.stem.2008.03.002
- Biase P de und Capanna R (2005): Clinical applications of BMPs. In: *Injury*, 36(3), S. 43-46 – DOI: 10.1016/j.injury.2005.07.034
- Bijlsm, J W J, Jacobs J W G und Buttgereit F (2015): Glucocorticoids in the treatment of rheumatoid arthritis. In: *Clinical and experimental rheumatology*, 33 (4 Suppl 92), S. 34-6 – PMID: 26457916

Blank U, Warsi S, Andradottir S R E und Karlsson S (2012): A Critical Role for BMP Signaling in Adult Hematopoietic Stem Cells. In: *Blood*, 120(21), S. 1194 – DOI: 10.1182/blood.V120.21.1194.1194

Boileau C, Pelletier J-P, Tardif G, Fahmi H, Laufer S, Lavigne M und Martel-Pelletier J (2005): The regulation of human MMP-13 by licofelone, an inhibitor of cyclo-oxygenases and 5-lipoxygenase, in human osteoarthritic chondrocytes is mediated by the inhibition of the p38 MAP kinase signalling pathway. In: *Annals of the rheumatic diseases*, 64(6), S. 891-898 – DOI: 10.1136/ard.2004.026906

Branly T, Bertoni L, Contentin R, Rakic R, Gomez-Leduc T und Desancé M (2017): Characterization and use of Equine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Equine Cartilage Engineering. Study of their Hyaline Cartilage Forming Potential when Cultured under Hypoxia within a Biomaterial in the Presence of BMP-2 and TGF- β 1. In: *Stem cell reviews and reports*, 13(5), S. 611-630 – DOI: 10.1007/s12015-017-9748-y

Brittberg M (2008): Autologous chondrocyte implantation--technique and long-term follow-up. In: *Injury*, 1(39), S. 40-499 – DOI: 10.1016/j.injury.2008.01.040

Brittberg M, Peterson L, Sjögren-Jansson E, Tallheden T und Lindahl A (2003): Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. In: *The Journal of bone and joint surgery. American*, 85-A(Suppl 3), S. 109-115 – DOI: 10.2106/00004623-200300003-00017

Busschers E, Holt J P und Richardson D W (2010): Effects of glucocorticoids and interleukin-1 beta on expression and activity of aggrecanases in equine chondrocytes. In: *American journal of veterinary research*, 71(2), S. 176-185 – DOI: 10.2460/ajvr.71.2.176

Caporali R, Todoerti M, Sakellariou G und Montecucco C (2013): Glucocorticoids in rheumatoid arthritis. In: *Drugs*, 73(1), S. 31-43 – DOI: 10.1007/s40265-013-0008-4

Caron M J, Welting T J, Surtel D A, Cremers A, Coolsen M M, Rhijn L W van und Emans P J (2012): BMP-2 and BMP-7: differential regulation of chondrogenic differentiation. In: *Osteoarthritis and cartilage*, 20, S.151 – DOI: 10.1016/j.joca.2012.02.220

Caron M M J, Emans P J, Coolsen M M E, Voss L, Surtel D A M und Cremers A (2012b): Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. In: *Osteoarthritis and cartilage*, 20(10), S. 1170-1178 – DOI: 10.1016/j.joca.2012.06.016

Caron, M M J, Emans, P J, Cremers, A, Surtel, D A M, Coolsen, M M E, van Rhijn, L W, Welting, T J M (2013): Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of

progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. In: *Osteoarthritis and cartilage*, 21(4), S. 604-613 – DOI: 10.1016/j.joca.2013.01.009.

Casser H-R, Arnold B, Brinkschmidt T, Gralow I, Irnich D und Klimczyk K (2013): Interdisziplinäres Assessment zur multimodalen Schmerztherapie. Indikation und Leistungsumfang. In: *Schmerz* (Berlin, Germany), 27(4), S. 363-370 – DOI: 10.1007/s00482-013-1337-7

Chawla A, Schwarz E J, Dimaculangan D D und Lazar M A (1994): Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. In: *Endocrinology*, 135(2), S. 798-800 – DOI: 10.1210/endo.135.2.8033830

Chen M J, Whiteley J P, Please C P, Ehlicke F, Waters S L, Byrne H M (2019): Identifying chondrogenesis strategies for tissue engineering of articular cartilage. In: *Journal of tissue engineering*, 10 – DOI: 10.1177/2041731419842431

Chen Y, Caporali E und Stewart M (2016): Bone morphogenetic protein 2 stimulates chondrogenesis of equine synovial membrane-derived progenitor cells. In: *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : VCOT* 29 (5), S. 378–385 – DOI: 10.3415/VCOT-16-02-0035.

Chien, Szu-Yu, Tsai, Chun-Hao, Liu, Shan-Chi, Huang, Chien-Chung, Lin, Tzu-Hung, Yang, Yu-Zhen, Tang, Chih-Hsin (2020): Noggin Inhibits IL-1 β and BMP-2 Expression, and Attenuates Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Destruction in Experimental Osteoarthritis. In: *Cells* 9 (4), S.927 – DOI: 10.3390/cells9040927.

Chijimatsu R, Kobayashi M, Ebina K, Iwahashi T, Okuno Y und Hirao M (2018): Impact of dexamethasone concentration on cartilage tissue formation from human synovial derived stem cells in vitro. In: *Cytotechnology* 70 (2), S. 819–829 – DOI: 10.1007/s10616-018-0191-y.

Coffman R L, Lebman D A und Shrader B (2009): Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989 170: 1039-1044. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 182(1), S. 8-13 – DOI: 10.1084/jem.170.3.1039

Collins E, Gu F, Qi M, Molano I, Ruiz P, Sun L, Gilkeson und Gary S (2014): Differential efficacy of human mesenchymal stem cells based on source of origin. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 193(9), S. 4381-4390 – DOI: 10.4049/jimmunol.1401636

Convery F R, Akeson W H und Keown G H (1972): The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. In: *Clinical orthopaedics and related research*, 82, S. 253-262 – PMID: 5011034

Coutinho A E, Chapman K E (2011): The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. In: *Molecular and cellular endocrinology*, 335(1), S. 2-13 – DOI: 10.1016/j.mce.2010.04.005

D'Angelo M, Yan Z, Nooreyazdan M, Pacifici M, Sarment D S, Billings P C und Leboy P S (2000): MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. In: *Journal of cellular biochemistry*, 77(4), S. 678-693 – DOI: 10.1002/(SICI)1097-4644(20000615)77:4<678::AID-JCB15>3.0.CO;2-P

Della B E, Menzel U, Basoli V, Tourbier C, Alini M und Stoddart M J (2020): Differential Regulation of circRNA, miRNA, and piRNA during Early Osteogenic and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells. In: *Cells*, 9(2) – DOI: 10.3390/cells9020398

Deng Z H, Li Y S, Gao X, Lei G H und Huard J (2018): Bone morphogenetic proteins for articular cartilage regeneration. In: *Osteoarthritis and cartilage*, 26(9), S. 1153-1161 – DOI: 10.1016/j.joca.2018.03.007

Dhinsa B S und Adesida A B (2012): Current clinical therapies for cartilage repair, their limitation and the role of stem cells. In: *Current stem cell research & therapy*, 7(2), S. 143-148 – DOI: 10.2174/157488812799219009

Di Chen Z, Ming M und Gregory R (2004): Bone morphogenetic proteins. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 22(4), S. 233-241 – DOI: 10.1080/08977190412331279890

Dimmeler S, Ding S, Rando T A und Trounson A (2014): Translational strategies and challenges in regenerative medicine. In: *Nature medicine*, 20(8), S. 814-821 – DOI: 10.1038/nm.3627

Djouad F, Bony C, Häupl T, Uzé G, Lahlou N und Louis-Plence P (2005): Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. In: *Arthritis research & therapy*, 7(6), R1304-15 – DOI: 10.1186/ar1827

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F und Krause D (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy*, 8(4), S. 315-317 – DOI: 10.1080/14653240600855905

Erggelet C (2000): Die autologe Chondrozytentransplantation. In: Imhoff AB (Hrsg.) Knie. Fortbildung Orthopädie, Die ASG-Kurse der DGOT, 3. Heidelberg: Steinkopff – ISBN: 978-3-642-57733-8

Fahy N, Alini M und Stoddart M J (2018): Mechanical stimulation of mesenchymal stem cells: Implications for cartilage tissue engineering. In: Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 36(1), S. 52-63 – DOI: 10.1002/jor.23670

Farndale R, Buttle D und Barrett A (1986): Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 883(2), S. 173-177 – DOI: 10.1016/0304-4165(86)90306-5

Friedenstein A J (1976): Precursor Cells of Mechanocytes. In: Geoffrey Howard Bourne und James Frederic Danielli (Hg.): International review of cytology, 47(47), S. 327-359 – DOI: 10.1016/s0074-7696(08)60092-3

Gale A L, Linardi R L, McClung G, Mammone R M und Orved, K F (2019): Comparison of the Chondrogenic Differentiation Potential of Equine Synovial Membrane-Derived and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. In: Frontiers in veterinary science, 6, S. 178 – DOI: 10.3389/fvets.2019.00178

Gardner O F W, Archer C W, Alini M und Stoddart M J (2013): Chondrogenesis of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering. In: Histology and histopathology, 28(1), S. 23-42 – DOI: 10.14670/HH-28.23

Gardner O F W, Alini M und Stoddart M J (2015): Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow. In: Methods in molecular biology (Clifton, NJ.), 1340, S. 41-52 – DOI: 10.1007/978-1-4939-2938-2_3

Gardner O F W, Fahy N, Alini M und Stoddart M J (2017): Joint mimicking mechanical load activates TGF β 1 in fibrin-poly(ester-urethane) scaffolds seeded with mesenchymal stem cells. In: Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 11(9), S. 2663-2666 – DOI: 10.1002/term.2210

Garvican E R, Vaughan-Thomas A, Redmond C, Gabriel N und Clegg P D (2010): MMP-mediated collagen breakdown induced by activated protein C in equine cartilage is reduced by corticosteroids. In: Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 28(3), S. 370-378 – DOI: 10.1002/jor.21001

Gautschi O P, Frey S P und Zellweger R (2007): Bone morphogenetic proteins in clinical applications. In: ANZ journal of surgery 77 (8), S. 626–631 – DOI: 10.1111/j.1445-2197.2007.04175.x.

Glueck M, Gardner O, Czekanska E, Alini M, Stoddart M J, Salzmänn G M und Schmal H (2015): Induction of Osteogenic Differentiation in Human Mesenchymal Stem Cells by Crosstalk with Osteoblasts. In: BioResearch open access, 4(1), S. 121-130 – DOI: 10.1089/biores.2015.0002

Graceffa V, Vinatier C, Guicheux J, Stoddart M, Alini M und Zeugolis D I (2019): Chasing Chimeras - The elusive stable chondrogenic phenotype. In: Biomaterials, 192, S. 199-225 – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.11.014

Grgurevic L, Pecina M, Vukicevic S (2017): Marshall R Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins. In: International orthopaedics, 41(5), S. 1065-1069 – DOI: 10.1007/s00264-017-3402-9

Gründer T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J und Aicher W K (2004): Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. In: Osteoarthritis and cartilage, 12(7), S. 559-567 – DOI: 10.1016/j.joca.2004.04.001

Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F und Ding J (2019): Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. In: Cells, 8(8) – DOI: 10.3390/cells8080886

Hanna H, Mir L M und Andre F M (2018): In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. In: Stem cell research & therapy, 9(1), S. 203 – DOI: 10.1186/s13287-018-0942-x

He Y, Manon-Jensen T, Arendt-Nielsen L, Pedersen K K, Christiansen T und Samuels J (2018): A biomarker of hypertrophic chondrocytes, type X collagen, completely distinguishes between OA and RA. In: Osteoarthritis and cartilage, 26, S. 175-176 – DOI: 10.1016/j.joca.2018.02.380

He Y, Siebuhr A S, Brandt-Hansen N U, Wang J und Di Su Z Q (2014a): Type X collagen levels are elevated in serum from human osteoarthritis patients and associated with biomarkers of cartilage degradation and inflammation. In: BMC musculoskeletal disorders, 15, S. 309 – DOI: 10.1186/1471-2474-15-309

Henkelmann R, Schmal H, Pilz I H, Salzmänn G M, Dovi-Akue D und Südkamp N P (2015): Prospective clinical trial of patients who underwent ankle arthroscopy with articular diseases

- to match clinical and radiological scores with intra-articular cytokines. In: International orthopaedics, 39(8), S. 1631-1637 – DOI: 10.1007/s00264-015-2797-4
- Hinton R J, Jing Y, Jing, J, Feng, J Q (2017): Roles of Chondrocytes in Endochondral Bone Formation and Fracture Repair. In: Journal of dental research 96 (1), S. 23–30 – DOI: 10.1177/0022034516668321.
- Holley, R W (1975): Control of growth of mammalian cells in cell culture. In: Nature 258 (5535), S. 487–490 – DOI: 10.1038/258487a0.
- Huang S S und Huang J S. (2005): TGF-beta control of cell proliferation. In: Journal of cellular biochemistry, 96(3), S. 447-462 – DOI: 10.1002/jcb.20558
- Imhoff A B (Hrsg.) (2000): Knie. Fortbildung Orthopädie, Die ASG-Kurse der DGOT, 3. Heidelberg: Steinkopff – ISBN: 978-3-642-57733-8
- Inada M, Wang Y, Byrne M H, Rahman M U, Miyaura C, López-Otín C und Krane S M (2004): Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(49), S. 17192-17197 – DOI: 10.1073/pnas.0407788101
- In't Anker P S, Scherjon, S A, Kleijburg-van der Keur C, Groot-Swings, Godelieve M J S de, Claas F H J, Fibbe W E und Kanhai, Humphrey H H (2004): Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. In: Stem cells (Dayton, Ohio), 22(7), S. 1338-1345 – DOI: 10.1634/stemcells.2004-0058
- Jiang X, Huang B, Yang H, Li G, Zhang C und Yang G (2017): TGF-β1 is Involved in Vitamin D-Induced Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Regulating the ERK/JNK Pathway. In: Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 42(6), S. 2230-2241 – DOI: 10.1159/000479997
- Jiang Y, Fischbach S, Xiao X (2018): The Role of the TGFβ Receptor Signaling Pathway in Adult Beta Cell Proliferation. In: International journal of molecular sciences, 19(10) – DOI: 10.3390/ijms19103136
- Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L und Westermarck J (1997): Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. In: Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, 208(3), S. 387-397 – DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<387::AID-AJA9>3.0.CO;2-E.

Johnstone B, Hering T M, Caplan A I, Goldberg V M und Yoo, J U (1998): In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. In: *Experimental cell research*, 238(1), S. 265-272 – DOI: 10.1006/excr.1997.3858

Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, Dodge G R, Eglin D und Guilak F (2013): Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. In: *European cells & materials*, 25, S. 248-267 – DOI: 10.22203/ecm.v025a18

Jones S, Horwood N, Cope A und Dazzi F (2007): The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(5), S. 2824-2831 – DOI: 10.4049/jimmunol.179.5.2824

Jüngel A, Ospelt C, Lesch M, Thiel M, Sunyer T und Schorr O (2010): Effect of the oral application of a highly selective MMP-13 inhibitor in three different animal models of rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases*, 69(5), S. 898-902 – DOI: 10.1136/ard.2008.106021

Kaiser M, Haag J, Söder S, Bau B und Aigner T (2004): Bone morphogenetic protein and transforming growth factor beta inhibitory Smads 6 and 7 are expressed in human adult normal and osteoarthritic cartilage in vivo and are differentially regulated in vitro by interleukin-1beta. In: *Arthritis and rheumatism*, 50(11), S. 3535-3540 – DOI: 10.1002/art.20750

Kaiser U, Sabatowski R und Azad S C (2015): Multimodale Schmerztherapie. Eine Standortbestimmung. In: *Schmerz (Berlin, Germany)*, 29(5), S. 550-556 – DOI: 10.1007/s00482-015-0030-4

Kalamegam G, Memic A, Budd E, Abbas M, Mobasheri A (2018): A Comprehensive Review of Stem Cells for Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. In: *Advances in experimental medicine and biology*, 1089, S. 23-36 – DOI: 10.1007/5584_2018_205

Kang Q, Sun M H, Cheng H, Peng Y, Montag A G und Deyrup A T (2004): Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. In: *Gene therapy*, 11(17), S. 1312-1320 – DOI: 10.1038/sj.gt.3302298

Kehrl J H, Roberts A B, Wakefield L M, Jakowlew S, Sporn, M B und Fauci A S (1986a): Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 137(12), S. 3855-3860 – PMID: 2878044

Kehrl J H, Wakefield L M, Roberts A B, Jakowlew S, Alvarez-Mon M und Derynck R (1986b): Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. In: *The Journal of experimental medicine*, 163(5), S. 1037-1050 – DOI: 10.1084/jem.163.5.1037

Keller B, Yang T, Chen Y, Munivez E, Bertin T, Zabel B und Lee B (2011): Interaction of TGF β and BMP signaling pathways during chondrogenesis. In: *PloS one*, 6(1) – DOI: 10.1371/journal.pone.0016421

Kiani C, Chen L, Wu Y J, Yee A J und Yang B B (2002): Structure and function of aggrecan. In: *Cell research*, 12(1), S. 19-32 – DOI: 10.1038/sj.cr.7290106

Kielty C M, Kwan A P, Holmes D F, Schor S L und Grant M E (1985): Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes. In: *The Biochemical journal*, 227(2), S. 545-554 – DOI: 10.1042/bj2270545

Kishigami S und Mishina Y (2005): BMP signaling and early embryonic patterning. In: *Cytokine & growth factor reviews*, 16(3), S. 265-278 – DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.002

Koenig B B, Cook J S, Wolsing D H, Ting J, Tiesman J P und Correa P E (1994): Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. In: *Molecular and cellular biology*, 14(9), S. 5961-5974 – DOI: 10.1128/mcb.14.9.5961

Komori T (2011): Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. In: *Journal of cellular biochemistry*, 112(3), S. 750-755 – DOI: 10.1002/jcb.22994

Kovermann N J, Basoli V, Della Bella E, Alini M, Lischer C, Schmal H (2019): BMP2 and TGF- β Cooperate Differently during Synovial-Derived Stem-Cell Chondrogenesis in a Dexamethasone-Dependent Manner. In: *Cells*, 8(6), S.636 – DOI: 10.3390/cells8060636

Kroon L M G de, Narcisi R, Akker G G H van den, Vitters E L, Blaney Davidson E N, Osch, Gerjo J V M van, Kraan P M van der (2017): SMAD3 and SMAD4 have a more dominant role than SMAD2 in TGF β -induced chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Scientific reports*, 7, S. 43164 – DOI: 10.1038/srep43164

Kroot E-J A, Huisman A M, Zeven J van, Wouters J M G W, Paassen H C van (2006): Oral pulsed dexamethasone therapy in early rheumatoid arthritis: a pilot study. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069, S. 300-306 – DOI: 10.1196/annals.1351.028

Kubosch E J, Heidt E, Bernstein A, Böttiger K, Schmal H (2016): The trans-well coculture of human synovial mesenchymal stem cells with chondrocytes leads to self-organization, chondrogenic differentiation, and secretion of TGF β . In: *Stem cell research & therapy*, 7(1), S. 64 – DOI: 10.1186/s13287-016-0322-3

- Kubosch E J, Heidt E, Niemeyer P, Bernstein A, Südkamp N P und Schmal H (2017): In-vitro chondrogenic potential of synovial stem cells and chondrocytes allocated for autologous chondrocyte implantation - a comparison : Synovial stem cells as an alternative cell source for autologous chondrocyte implantation. In: *International orthopaedics*, 41(5), S. 991-998 – DOI: 10.1007/s00264-017-3400-y
- Kubosch E J, Lang G, Furst D, Kubosch D, Izadpanah K und Rolauffs B (2018): The Potential for Synovium-derived Stem Cells in Cartilage Repair. In: *Current stem cell research & therapy*, 13(3), S. 174-184 – DOI: 10.2174/1574888X12666171002111026
- Kwon S-H, Lee T-J, Park J, Hwang J-E, Jin M und Jang H -K (2013): Modulation of BMP-2-induced chondrogenic versus osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by cell-specific extracellular matrices. In: *Tissue Engineering. Part A*, 19(1-2), S. 49-58 – DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0245
- Labarca, C und Paigen K (1980): A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. In: *Analytical Biochemistry*, 102(2), S. 344-352 – DOI: 10.1016/0003-2697(80)90165-7
- Langer R J (1993): Tissue engineering. In: *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), S. 920-926 – DOI: 10.1126/science.8493529
- Larraín J, Bachiller D, Lu B, Agius E, Piccolo S und Robertis E M de (2000): BMP-binding modules in chordin: a model for signalling regulation in the extracellular space. In: *Development (Cambridge, England)*, 127(4), S. 821-830 – PMID: 10648240
- Le Blanc K und Ringdén O (2007): Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. In: *Journal of internal medicine*, 262(5), S. 509-525 – DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x
- Legendre F, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, Bouyoucef M, Hervieu M und Gruchy N (2017): Enhanced chondrogenesis of bone marrow-derived stem cells by using a combinatory cell therapy strategy with BMP-2/TGF- β 1, hypoxia, and COL1A1/HtrA1 siRNAs. In: *Scientific reports*, 7(1), S. 3406 – DOI: 10.1038/s41598-017-03579-y
- Li F, Tang Y, Song B, Yu M, Li Q und Zhang C (2019): Nomenclature clarification: synovial fibroblasts and synovial mesenchymal stem cells. In: *Stem cell research & therapy*, 10(1), S. 260 – DOI: 10.1186/s13287-019-1359-x
- Li J und Dong S (2016): The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. In: *Stem cells international 2016*, S. 2470351 – DOI: 10.1155/2016/2470351

- Li N-G, Shi Z-H, Tang Y-P, Wang Z-J, Song S-L und Qian L-H (2011): New hope for the treatment of osteoarthritis through selective inhibition of MMP-13. In: *Current medicinal chemistry*, 18(7), S. 977–1001 – DOI: 10.2174/092986711794940905
- Li T-F, Darowish M, Zuscik M J, Di C, Schwarz E M und Rosier R N et al. (2006): Smad3-deficient chondrocytes have enhanced BMP signaling and accelerated differentiation. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21(1), S. 4-16 – DOI: 10.1359/JBMR.050911
- Loebel C, Czekanska E M, Bruderer M, Salzmann G, Alini M und Stoddart M J (2015): In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. In: *Tissue Engineering. Part A*, 21(1-2), S. 115-123 – DOI: 10.1089/ten.TEA.2014.0096.
- Lu Y C S, Evans C H und Grodzinsky A J (2011): Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. In: *Arthritis research & therapy*, 13(5), R142 – DOI: 10.1186/ar3456
- Lüllmann-Rauch R (2009): *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl.* Stuttgart: Thieme – ISBN: 9783132425293
- Lykissas M und Gkiatas I (2017): Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine surgery. In: *World Journal of Orthopedics* 8 (7), S. 531–535 – DOI: 10.5312/wjo.v8.i7.531
- Mackay A M, Beck S C, Murphy J M, Barry F P, Chichester C O und Pittenger M F (1998): Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. In: *Tissue engineering*, 4(4), S. 415-428 – DOI: 10.1089/ten.1998.4.415
- Maioli M, Basoli V, Santaniello S, Cruciani S, Delitala A P und Pinna R (2016): Osteogenesis from Dental Pulp Derived Stem Cells: A Novel Conditioned Medium Including Melatonin within a Mixture of Hyaluronic, Butyric, and Retinoic Acids. In: *Stem cells international* 2016, S. 2056416 – DOI: 10.1155/2016/2056416
- Majumdar M K, Wang E und Morris E A (2001): BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. In: *Journal of cellular physiology*, 189(3), S. 275-284 – DOI: 10.1002/jcp.10025
- Mardani M, Hashemibeni B, Ansar M M, Zarkesh E, Sayeed H, Kazemi M und Goharian V (2013): Comparison between Chondrogenic Markers of Differentiated Chondrocytes from

Adipose Derived Stem Cells and Articular Chondrocytes In Vitro. In: Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 16(6), S. 763-773 – PMID: 23997902

Mark K von der, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Glückert K und Stöss, H (1992): Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. In: Arthritis and rheumatism, 35(7), S. 806-811 – DOI: 10.1002/art.1780350715

Martin J A und Buckwalter J A (2001): Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. In: The Iowa orthopaedic journal, 21(1-7) – PMID: 11813939

Massagué J und Xi Q (2012): TGF- β control of stem cell differentiation genes. In: FEBS letters, 586(14), S. 1953-1958 – DOI: 10.1016/j.febslet.2012.03.023

Mazur C M, Woo J J, Yee C S, Fields A J, Acevedo C und Bailey K N (2019): Osteocyte dysfunction promotes osteoarthritis through MMP13-dependent suppression of subchondral bone homeostasis. In: Bone research 7, S. 34 – DOI: 10.1038/s41413-019-0070-y

Mehlhorn A T, Niemeyer P, Kaschte K, Muller L, Finkenzeller G und Hartl D (2007): Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. In: Cell proliferation, 40(6), S. 809-823 – DOI: 10.1111/j.1365-2184.2007.00473.x

Miyazono K, Kamiya Y und Morikawa M (2010): Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. In: Journal of biochemistry, 147(1), S. 35-51 – DOI: 10.1093/jb/mvp148

Moses H L, Roberts A B und Derynck R (2016): The Discovery and Early Days of TGF- β : A Historical Perspective. In: Cold Spring Harbor perspectives in biology, 8(7) – DOI: 10.1101/cshperspect.a021865

Mueller M B und Tuan R S (2008): Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. Arthritis and rheumatism, 58, S. 1377-1388 – DOI: 10.1002/art.23370

Mueller M B Fischer M, Zellner J, Berner A, Dienstknecht T, Prantl L, Kujat R, Nerlich M, Tuan R S und Angele P (2010): Hypertrophy in mesenchymal stem cell chondrogenesis: effect of TGF-beta isoforms and chondrogenic conditioning. In: Cells 192, S. 158-166 – DOI: 10.1159/000313399

Murphy C, Mobasheri A, Táncos Z, Kobilák J und Dinnyés A (2018): The Potency of Induced Pluripotent Stem Cells in Cartilage Regeneration and Osteoarthritis Treatment. In: Advances in experimental medicine and biology, 1079, S. 55-68 – DOI: 10.1007/5584_2017_141

Murphy M K, Huey D J, Hu J C, Athanasiou und Kyriacos A (2015): TGF- β 1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells. In: Stem cells (Dayton, Ohio), 33(3), S. 762-773 – DOI: 10.1002/stem.1890

Niemeyer P, Andereya S, Angele P, Ateschrang A, Aurich M und Baumann M (2013): Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks - Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU In: Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie, 151(1), S. 38-47 – DOI: 10.1055/s-0032-1328207

Nifuji A und Noda M (1999): Coordinated expression of noggin and bone morphogenetic proteins (BMPs) during early skeletogenesis and induction of noggin expression by BMP-7. In: Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 14(12), S. 2057-2066 – DOI: 10.1359/jbmr.1999.14.12.2057

Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis Y I und Knaus P (2002): The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. In: The Journal of biological chemistry, 277(7), S. 5330-5338 – DOI: 10.1074/jbc.M102750200

Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B und Steinert A (2007): Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. In: Journal of biomedical materials research. Part A, 83(3), S. 626-635 – DOI: 10.1002/jbm.a.31254

Oka K, Oka S, Sasaki T, Ito Y, Bringas P, Nonaka K und Chai Y (2007): The role of TGF- β signaling in regulating chondrogenesis and osteogenesis during mandibular development. In: Developmental biology, 303(1), S. 391-404 – DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.11.025

Oshimori N und Fuchs E (2012): The harmonies played by TGF- β in stem cell biology. In: Cell stem cell, 11(6), S. 751-764 – DOI: 10.1016/j.stem.2012.11.001

Ossendorf C, Steinwachs M R, Kreuz P C, Osterhoff G, Lahm A, Ducommun P P und Erggelet C (2011): Autologous chondrocyte implantation (ACI) for the treatment of large and complex cartilage lesions of the knee. Sports medicine, arthroscopy, rehabilitation, therapy & technology SMARTT 21(3), S. 11 – DOI: 10.1186/1758-2555-3-11

Park S-Y, Kim K-H, Kim S, Lee Y-M und Seol Y-J (2019): BMP-2 Gene Delivery-Based Bone Regeneration in Dentistry. In: Pharmaceutics 11(8), S. 393 – DOI: 10.3390/pharmaceutics11080393

Park Y, Sugimoto M, Watrin A, Chiquet M und Hunziker EB (2005): BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. In: *Osteoarthritis and cartilage* 13(6), S. 527-536 – DOI: 10.1016/j.joca.2005.02.006

Park J S, Yang H N, Woo D G, Jeon S Y, Do H-J, Lim H-Y (2011): Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells mediated by the combination of SOX trio SOX5, 6, and 9 genes complexed with PEI-modified PLGA nanoparticles. In: *Biomaterials*, 32(14), S. 3679-3688 – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.063

Park Y, Sugimoto M, Watrin A, Chiquet M, Hunziker E B (2005): BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. In: *Osteoarthritis and cartilage*, 13(6), S. 527-536 – DOI: 10.1016/j.joca.2005.02.006

Pattappa G, Johnstone B, Zellner J, Docheva D und Angele P (2019a): The Importance of Physioxia in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis and the Mechanisms Controlling Its Response. In: *International journal of molecular sciences* 20(3), S. 484 – DOI: 10.3390/ijms20030484

Pattappa G, Schewior R, Hofmeister I, Seja J, Zellner J, Johnstone B, Docheva D und Angele P (2019b): Physioxia Has a Beneficial Effect on Cartilage Matrix Production in Interleukin-1 Beta-Inhibited Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. In: *Cells* 8(8), S. 936 – DOI: 10.3390/cells8080936

Pattappa G, Zellner J, Johnstone B, Docheva D und Angele P (2019c): Cells under pressure - the relationship between hydrostatic pressure and mesenchymal stem cell chondrogenesis. *European cells materials*, 37, S. 360-381 – DOI: 10.22203/eCM.v037a22

Pei M, He F und Vunjak-Novakovic G (2008): Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. *Differentiation*, In: *Research in biological diversity* 76(10), S. 1044–1056 – DOI: 10.1111/j.1432-0436.2008.00299.x

Perera J R, Jaiswal P K, Khan W S. (2012): The potential therapeutic use of stem cells in cartilage repair. In: *Current stem cell research & therapy*, 7(2), S. 149-156 – DOI: 10.2174/157488812799219054

Peterson L, Vasiliadis H S, Brittberg M und Lindahl A (2010): Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. In: *The American journal of sports medicine*, 38, S. 1117-1124 – DOI: <https://doi.org/10.1177/0363546509357915>

- Pizzute T, Lynch K und Pei M (2015): Impact of tissue-specific stem cells on lineage-specific differentiation: a focus on the musculoskeletal system. In: *Stem cell reviews and reports*, 11, 119-132 – DOI:10.1007/s12015-014-9546-8
- Richardson D W und Dodge G R (2003): Dose-dependent effects of corticosteroids on the expression of matrix-related genes in normal and cytokine-treated articular chondrocytes. In: *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society*, 52(1), S. 39-49 – DOI: 10.1007/s000110300012
- Roberts A B, Anzano M A, Lamb L C, Smith J M und Sporn M B (1981): New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9): S. 5339-5343 – DOI: 10.1073/pnas.78.9.5339
- Ronchetti S, Migliorati G, Bruscoli S und Riccardi C (2018): Defining the role of glucocorticoids in inflammation. In: *Clinical science (London, England : 1979)*, 132(14), S. 1529-1543 – DOI: 10.1042/CS20171505
- Rosen V (2009): BMP2 signaling in bone development and repair. In: *Cytokine & growth factor reviews*, 20(5-6), S. 475-480 – DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.018
- Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G und Liedtke S (2016): No Identical "Mesenchymal Stem Cells" at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. In: *Stem cell reports*, 6(6), S. 897-913 – DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.05.011
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T (2005): Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. In: *Arthritis and rheumatism*, 52(8), S. 2521-2529 – DOI: 10.1002/art.21212
- Salazar V S, Gamer L W und Rosen V (2016): BMP signalling in skeletal development, disease and repair. In: *Nature reviews. Endocrinology*, 12(4), S. 203-221 – DOI: 10.1038/nrendo.2016.12
- Sanjabi S, Oh S A und Li M O (2017): Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(6) – DOI: 10.1101/cshperspect.a022236
- Santos V H, Pfeifer J P H, Souza J B de, Milani B H G, Oliveira R A de, Assis M G, Deffune E, Moroz A und Alves A L G (2018): Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. *BMC veterinary research*, 27; 14(1), S. 114 – DOI: 10.1186/s12917-018-1425-0

Schmal H, Niemeyer P, Zwingmann J, Stoffel F, Südkamp N P, Mehlhorn A T (2010): Association between expression of the bone morphogenetic proteins 2 and 7 in the repair of circumscribed cartilage lesions with clinical outcome. In: BMC musculoskeletal disorders, 11(1), S. 170 – DOI: 10.1186/1471-2474-11-170

Schmitt B, Ringe J, Häupl T, Notter M, Manz R, Burmester G-R (2003): BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. In: Differentiation; research in biological diversity, 71(9-10), S. 567-577 – DOI: 10.1111/j.1432-0436.2003.07109003.x

Scott M A, Nguyen V T, Levi B und James A W (2011): Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. In: Stem cells and development, 20(10), S. 1793-1804 – DOI: 10.1089/scd.2011.0040

Sekiya I, Larson B L, Vuoristo J T, Cui J-, Prockop D J (2004): Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). In: Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 19(2), S. 256-264 – DOI: 10.1359/JBMR.0301220

Shaikh S, Verma H, Yadav N, Jauhari M und Bullangowda J (2012): Applications of Steroid in Clinical Practice: A Review. In: ISRN Anesthesiology 2012, S. 1-11 – DOI: 10.5402/2012/985495

Shen B, Wei A, Tao H, Diwan A D und Ma D D F (2009): BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture. In: Tissue Engineering. Part A, 15(6), S. 1311-1320 – DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0132

Shintani N und Hunziker E B (2011): Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. In: European cells & materials, 24;22, S. 302-19; discussion 319-20 – DOI: 10.22203/ecm.v022a23

Shintani N und Hunziker E B (2007): Chondrogenic differentiation of bovine synovium: bone morphogenetic proteins 2 and 7 and transforming growth factor beta1 induce the formation of different types of cartilaginous tissue. In: Arthritis and rheumatism, 56(6), S. 1869-1879 – DOI: 10.1002/art.22701

Shintani N, Siebenrock K A und Hunziker E B (2013): TGF-β1 enhances the BMP-2-induced chondrogenesis of bovine synovial explants and arrests downstream differentiation at an early stage of hypertrophy. In: PloS one, 8(1) – DOI: 10.1371/journal.pone.0053086

- Song B, Estrada K D und Lyons K M (2009): Smad signaling in skeletal development and regeneration. In: Cytokine und growth factor reviews, 20(5-6), S. 379-388 – DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.010
- Sophia Fox A J, Bedi A und Rodeo S A (2009): The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. In: Sports health, 1(6), S. 461-468 – DOI: 10.1177/1941738109350438
- Sporn M B und Todaro G J (1980): Autocrine secretion and malignant transformation of cells. In: The New England journal of medicine, 303(15), S. 878-880 – DOI: 10.1056/NEJM198010093031511
- Sporn MB und Roberts AB (1990): TGF-beta: problems and prospects. In: Cell Regulation. 1(12), S. 875-882. DOI:10.1091/mbc.1.12.875
- Sporn M B (2006): The early history of TGF-beta, and a brief glimpse of its future. In: Cytokine & growth factor reviews, 17(1-2), S. 3-7 – DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.012
- Stamenkovic, Ivan (2003): Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. In: The Journal of pathology 200 (4), S. 448–464 – DOI: 10.1002/path.1400.
- Tang X, Fan L, Pei M, Zeng L und Ge Z. (2015): Evolving concepts of chondrogenic differentiation: history, state-of-the-art and future perspectives. In: European cells & materials, 30, S. 12-27 – DOI: 10.22203/ecm.v030a02
- Thielen N G M, Kraan P M van der, Caam A P M van (2019): TGFβ/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. In: Cells, 8(9) – DOI: 10.3390/cells8090969
- To K, Zhang B, Romain K, Mak C und Khan W (2019): Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Cartilage Regeneration: A PRISMA Review of in vivo Studies. In: Frontiers in bioengineering and biotechnology, 7, S. 314 – DOI: 10.3389/fbioe.2019.00314
- Todaro G J, Larco J E de, Fryling C, Johnson P A und Sporn M B (1981): Transforming growth factors (TGFs): properties and possible mechanisms of action. In: Journal of supramolecular structure and cellular biochemistry, 15(3), S. 287-301 – DOI: 10.1002/jsscb.1981.380150306
- Toh W S, Liu H, Heng B C, Rufaihah A J, Ye C P und Cao T (2005): Combined effects of TGFbeta1 and BMP2 in serum-free chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced hyaline-like cartilage formation. In: Growth factors (Chur, Switzerland), 23(4), S. 313-321 – DOI: 10.1080/08977190500252763

Tsunawaki S, Sporn M, Ding A und Nathan C (1988): Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. In: *Nature*, 334(6179), S. 260-262 – DOI: 10.1038/334260a0

Ullah, Imran, Subbarao, Raghavendra Baregundi, Rho, Gyu Jin (2015): Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. In: *Bioscience reports* 35 (2) – DOI: 10.1042/BSR20150025.

Urist M R (1965): Bone: formation by autoinduction. In: *Science (New York, N.Y.)*, 150(3698), S. 893-899 – DOI: 10.1126/science.150.3698.893

Urist M R und Strates B S (1971): Bone morphogenetic protein. In: *Journal of dental research* 50 (6), S. 1392–1406 – DOI: 10.1177/00220345710500060601

Beuningen van H M, Glansbeek H L, Kraan van der P M und Berg van den W B (1998): Differential effects of local application of BMP-2 or TGF-beta 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. In: *Osteoarthritis and cartilage*, 6(5), S. 306-317 – DOI: 10.1053/joca.1998.0129

Beuningen van H M, Glansbeek H L, Kraan van der P M und Berg van den W B (2000): Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections. In: *Osteoarthritis and cartilage*, 8(1), S. 25-33 – DOI: 10.1053/joca.1999.0267

Beuningen van H M, Glansbeek H L, Kraan van der P M und Berg van den W B (1994): Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. In: *Laboratory investigation, a journal of technical methods and pathology*, 71(2), S. 279-290 – PMID: 8078307

Kraan van der P M und Berg van der W B (2012): Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? In: *Osteoarthritis and cartilage*, 20(3), S. 223-232 – DOI: 10.1016/j.joca.2011.12.003

Velden van der V H (1998): Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. In: *Mediators of inflammation*, 7(4), S. 229-237 – DOI: 10.1080/09629359890910

Vinatier C und Guicheux J (2016): Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. In: *Annals of physical and rehabilitation medicine*, 59(3), S. 139–144 – DOI: 10.1016/j.rehab.2016.03.002

Wang M, Sampson E R, Jin H, Li J, Ke Q H, Im H-J und Di C (2013): MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. In: *Arthritis research & therapy*, 15(1), R5 – DOI: 10.1186/ar4133

- Wang M-K, Sun H-Q, Xiang Y-C, Jiang F, Su Y-P und Zou Z-M (2012): Different roles of TGF- β in the multi-lineage differentiation of stem cells. In: *World journal of stem cells*, 4(5), S. 28–34 – DOI: 10.4252/wjsc.v4.i5.28
- Wang R N, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M und Peabody M (2014a): Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. In: *Genes & diseases*, 1(1), S. 87-105 – DOI: 10.1016/j.gendis.2014.07.005
- Wang W, Rigueur D und Lyons K M (2014b): TGF β signaling in cartilage development and maintenance. In: *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 102(1), S. 37-51 – DOI: 10.1002/bdrc.21058
- Wang Y und Nakayama N (2009): WNT and BMP signaling are both required for hematopoietic cell development from human ES cells. In: *Stem cell research*, 3(2-3), S. 113-125 – DOI: 10.1016/j.scr.2009.06.001
- Watanabe H, Yamada Y und Kimata K (1998): Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. In: *Journal of biochemistry*, 124(4), S. 687-693 – DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022166
- Wu M, Chen G und Li Y-P (2016): TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. In: *Bone research*, 4, S. 16009 – DOI: 10.1038/boneres.2016.9
- Xia P, Wang X, Qu Y, Lin Q, Cheng K und Gao M (2017): TGF- β 1-induced chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells is promoted by low-intensity pulsed ultrasound through the integrin-mTOR signaling pathway. In: *Stem cell research & therapy*, 8(1), S. 281 – DOI: 10.1186/s13287-017-0733-9
- Xie Z, Wang P, Li Y, Deng W, Zhang X und Su H (2016): Imbalance Between Bone Morphogenetic Protein 2 and Noggin Induces Abnormal Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Ankylosing Spondylitis. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 68(2), S. 430-440 – DOI: 10.1002/art.39433
- Yang L, Tsang K Y, Tang H C, Chan D und Cheah K S E (2014): Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), S. 12097-12102 – DOI: 10.1073/pnas.1302703111
- Yi S W, Kim H J, Oh H J, Shin H, Lee J S, Park J S und Park K-H (2018): Gene expression profiling of chondrogenic differentiation by dexamethasone-conjugated polyethyleneimine

with SOX trio genes in stem cells. In: Stem cell research & therapy, 9 – DOI: 10.1186/s13287-018-0998-7

Zehentner B K, Haussmann A und Burtscher H (2002): The bone morphogenetic protein antagonist Noggin is regulated by Sox9 during endochondral differentiation. In: Development, growth und differentiation, 44(1), S. 1-9 – DOI: 10.1046/j.1440-169x.2002.00616.x

Zhang Z, Wei X, Gao J, Zhao Y, Zhao Y und Guo L (2016): Intra-Articular Injection of Cross-Linked Hyaluronic Acid-Dexamethasone Hydrogel Attenuates Osteoarthritis: An Experimental Study in a Rat Model of Osteoarthritis. In: International journal of molecular sciences, 17(4), S. 411 – DOI: 10.3390/ijms17040411

Zhao G-Q (2003): Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. In: Genesis (New York, N.Y. : 2000), 35(1), S. 43-56 – DOI: 10.1002/gene.10167

Zhou N, Li Q, Lin X, Hu N, Liao J-Y und Lin L-B (2016): BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. In: Cell and tissue research, 366(1), S. 101-111 – DOI: 10.1007/s00441-016-2403-0

Zhou X, Mark K von der, Henry S, Norton W, Adams H und Crombrughe Benoit de (2014): Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. In: PLoS genetics, 10(12) – DOI: 10.1371/journal.pgen.1004820

Zippel N, Schulze M und Tobiasch E (2010): Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine. In: Recent patents on biotechnology, 4(1), S. 1-22 – DOI: 10.2174/187220810790069497

Danksagung

Die vorliegende Studie wurde in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, der AO Foundation in Davos und der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie der Freien Universität Berlin als Dissertation angenommen.

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen und folgender Institutionen hätte sie in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater und meinen Betreuern Prof. Dr. Christoph Lischer, Frau Dr. Johanna Kubosch, Prof. Dr. Martin Stoddart, die meine Arbeit stets mit viel Verständnis unterstützt haben und ohne die dieses Projekt und die Zusammenarbeit der einzelnen Institute nicht zustande gekommen wäre.

Für konstruktive Anregungen danke ich ebenso Prof. Dr. Hagen Schmal und Prof. Dr. Mauro Alini, die meine Doktorarbeit ebenso betreut haben.

Für vielfältige Unterstützung bin ich besonders Dr. Valentina Basoli und Dr. Elena della Bella des AO Foundation Institutes verbunden. Sie haben mich an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt, mir bei jeglichen Fragestellungen zur Seite gestanden und mir grundlegende Laborarbeiten, die für dieses Projekt erforderlich waren, erklärt und vorgestellt.

Mein besonderer Dank gilt schließlich neben vielen Freunden meinen Eltern und meiner Familie, die meine Arbeit mit großem Engagement unterstützt haben.

Finanzierungsquellen

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die AO Foundation in Davos und die Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Rheinbach, den 08.06.2021

Nikolas Kovermann