

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Chondrogenes Differenzierungspotential me-
senchymaler Stammzellen in hochdichten 3D-
Kulturen und im bioresorbierbaren Polymer-
Vlies**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Aldemar Andres Hegewald

aus Cali (Kolumbien)

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. M. Sittinger
 2. Priv.-Doz. Dr. med. C. Thomé
 3. Priv.-Doz. Dr. med. Chr. Erggelet

Datum der Promotion: 22.09.2006

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	3
<i>Widmung</i>	6
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	7
1 Einleitung	10
1.1 Knorpelgewebe im adulten Organismus	10
1.2 Degenerative Veränderungen von Gelenkknorpel	12
1.3 Regenerationspotential von Gelenkknorpel bei degenerativen Erkrankungen	13
1.4 Die Rolle von Hyaluronsäure bei der Therapie degenerativer Knorpelerkrankungen	14
1.5 Traumatologische Gelenkknorpeldefekte	14
1.6 Regenerationsmechanismen traumatologischer Gelenkknorpeldefekte	15
1.7 Chirurgische Verfahren bei der Therapie von Gelenkknorpeldefekten	16
1.7.1 Ziele und Strategien	16
1.7.2 Penetration subchondralen Knochens	17
1.7.3 Osteochondrale Transplantation	17
1.7.4 Perichondrium- und Periostlappenplastiken.....	18
1.7.5 Methoden des Tissue Engineering bei Knorpeldefekten	18
1.8 Trägerstrukturen im Tissue Engineering von Gelenk-Transplantaten	21
1.9 Stammzellen	23
1.9.1 Probleme und Chancen embryonaler Stammzellen (ESC).....	23
1.9.2 Hämatopoetische Stammzellen (HSC) und das Phänomen der Konversion	24
1.10 Mesenchymale Stammzellen (MSC)	24
1.10.1 Isolierung und Kultivierung von MSC	24
1.10.2 Charakterisierung von MSC	25
1.10.3 Differenzierung von MSC	27
1.10.4 Therapeutischer Einsatz von MSC	32
1.11 Chondrogenese von MSC	34
1.11.1 Transforming-growth-factor- β 1 (TGF- β 1) als Differenzierungsfaktor.....	34
1.11.2 Hyaluronsäuren als Differenzierungsfaktoren	34
1.11.3 Synovialflüssigkeit als Differenzierungsfaktor	36

1.12	Problemstellung	37
2	<i>Material und Methoden</i>	40
2.1	Materialien	40
2.1.1	Geräte	40
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	40
2.1.3	Lösungen und Reagenzien	41
2.1.4	Materialien und Reagenzien für die Färbungen	42
2.1.5	Software	42
2.2	Gewinnung equiner Knochenmarks-Aspirate	42
2.3	Isolierung mesenchymaler Stammzellen (MSC) aus equinen Knochenmarks-Punktaten	43
2.4	Kultivierung der MSC	44
2.4.1	Kulturbedingungen.....	44
2.4.2	Passagieren der Zellen.....	44
2.4.3	Einfrieren und Auftauen der MSC.....	45
2.4.4	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität.....	45
2.5	Chondrogene Medien	46
2.5.1	Definiertes Basismedium	46
2.5.2	Hyaluronsäuren	47
2.5.3	Autologe Synovialflüssigkeit	47
2.6	Ansetzen der hochdichten 3D-Kulturen	47
2.7	Versuchsordnung der hochdichten 3D-Kulturen	49
2.8	Ansetzen von 3D-Vlies-Kulturen	49
2.9	Versuchsordnung der 3D-Vlies-Kulturen	50
2.10	Histologie	50
2.10.1	Einfrieren und Schneiden der Proben.....	50
2.10.2	Alcianblau-Färbung der Schnitte mit Kernechtrot-Gegenfärbung.....	51
2.10.3	Quantitative Analyse der Alcianblau gefärbten Schnitte	51
2.10.4	Immunohistochemische Analyse	52
3	<i>Ergebnisse</i>	53
3.1	Gewinnung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen	53
3.2	Chondrogene Differenzierung in hochdichten 3D-Kulturen (Pellet-Kulturen)	54
3.2.1	TGF- β 1 und Hyaluronsäuren als induzierende Faktoren der Chondrogenese.....	55

3.2.2	Auotologe Synovialflüssigkeit als induzierender Faktor der Chondrogenese.....	60
3.2.3	Quantitative Proteoglycan-Expression chondrogenetisch induzierter MSC.....	62
3.3	Equine MSC im bioresorbierbaren Polymer-Vlies	62
3.3.1	Chondrogene Differenzierung in Vliesstrukturen	64
3.3.2	Einfluss von TGF- β 1 und Synovialflüssigkeit auf den Aufbau extrazellulärer Matrix im Vlies.....	65
4	<i>Diskussion</i>.....	69
4.1	Chondrogenes Potential equiner mesenchymaler Stammzellen (MSC).....	69
4.2	Chondrogene Differenzierung in hochdichten 3D-Kulturen.....	69
4.3	Zellkultur und chondrogene Differenzierung im bioresorbierbaren Polymer-Vlies	71
4.4	Ausblick	72
	<i>Zusammenfassung</i>.....	74
	<i>Abstract</i>.....	76
	<i>Schriftenverzeichnis</i>	78
	<i>Abbildungsverzeichnis</i>.....	88
	<i>Tabellenverzeichnis</i>	90
	<i>Curriculum vitae</i>.....	91
	<i>Erklärung</i>.....	94

Widmung

Meinen Eltern Dr. Heinz-Bodo Hegewald und Gloria Eloisa Hegewald gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

Abb. - Abbildung

AEC - Amino-9-ethylcarbazol

bHLH - Basic helix-loop-helix protein

BMP - Bone morphogenetic protein

BSA - Bovines Serumalbumin

°C - Grad Celsius

cbfa-1 - Core binding factor alpha1

CD - Cluster of differentiation

cm - Centimeter

Da - Dalton

DMEM - Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium

DMSO - Dimethylsulfoxid

E - Einheiten

EDTA - Ethylendiamin-Tetraessigsäure

ESC - Embryonale Stammzellen

EZM - Extrazellular-Matrix

FBS - Fetal bovine serum

FGF-2 - Fibroblast growth factor2

g - Gramm

g - Gravitationsbeschleunigung ($9,8 \text{ m/s}^2$)

GDFs - Growth and differentiation factors

HLA - Human leukocyte antigen

HSC - Hämatopoetische Stammzellen

I.E. - Internationale Einheiten

kg - Kilogramm

KG - Körpergewicht

KIE - Kallikrein-Inhibitor-Einheit

LRP-5 - Low density lipoprotein receptor-related protein5

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

mg - Miligramm

MHC - Major histocompatibility complex

Min. - Minuten

ml - Mililiter

mm - Milimeter

mM - Milimol

mRNA - Messenger ribonucleic acid

MSC - Mesenchymale Stamzellen

ng - Nanogramm

PBS - Phosphat buffered saline

PD - Population doubling

PGA - Poly-glycolic acid

PLA - Poly-lactid acid

PLGA - Poly-lactic-co-glycolic acid

Proc. - Processus

RT - Raumtemperatur

SH - Src homology domain

SMAD - Sma and Mad related proteins

Sox - SRY (sex determining region Y)-box

Std. - Stunden

Tab. - Tabelle

TGF- β 1 - Transforming-growth-factor- β 1

U - Units

UV - Ultraviolett

WISP-3 - Wnt1 inducible signaling pathway protein 3

μ g - Mikrogramm

μ l - Mikroliter

3-D – Dreidimensional

Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen (MSC) haben das Potential sich zu mesenchymalen Geweben zu differenzieren. Sie bieten sich daher als interessante Zellquelle für Ansätze des Tissue engineering im Knorpelbereich an. Unser Ziel war es, die Effekte von TGF- β 1, Hyaluronsäure (HA) und Synovialflüssigkeit (SF) auf die chondrogene Differenzierung equiner MSC in hochdichten 3D-Kulturen als auch im bioresorbierbaren Polymer-Vlies zu studieren.

Dafür wurde Knochenmark aus der Tibia von zwei 18 Monate alten Pferden gewonnen (Haflinger). Die MSC wurden mittels Zentrifugation über einen Percoll-Dichtegradienten isoliert.

Für die Chondrogenese in hochdichten 3-D-Kulturen wurden MSC zu Pellets zentrifugiert und in einem Medium kultiviert welches 10 ng/ml TGF β -1 oder 0,1 mg/ml HA (Hylartil®, Ostenil®) oder entweder 5%, 10% oder 50% autologe SF als Chondrogenese induzierenden Faktor enthielt. Im bioresorbierbaren Polymer-Vlies wurden entweder 10ng/ml TGF- β 1 oder 5% autologe SF als Chondrogenese induzierender Faktor genutzt.

Chondrogene Differenzierung wurde über die Expression von Kollagen Typ-II und Proteoglycan nachgewiesen. In hochdichten 3D-Kulturen zeigten mit TGF- β 1 induzierte MSC die höchste Proteoglycan-Expression. Die Kombination von TGF- β 1 mit HA zeigte keinen synergistischen Effekt. Kulturen, die nur mit SF (unabhängig von der Konzentration) oder nur mit HA stimuliert wurden, zeigten eine deutliche, aber niedrigere Proteoglycan-Expression als die mit TGF- β 1 stimulierten Kulturen. Die Expression von Kollagen Typ II war in allen stimulierten Kulturen vergleichbar hoch. Im bioresorbierbaren Vlies zeigten MSC sowohl unter TGF- β 1 als auch unter autologer SF die Fähigkeit, extrazelluläre Matrix zu bilden, die reich an Proteoglycanen war und zu einem festen, knorpelartigen Vlies-Zell-Integrat führte. Mit autologer SF induzierte MSC zeigten dabei eine homogenere Verteilung von Zellen und extrazellulärer Matrix im Vlies als bei TGF- β 1 induzierten MSC, wo sich die Zellen und die extrazelluläre Matrix mehr an der Oberfläche des Vlieses fanden.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass HA und SF Chondrogenese bei equinen MSC induzieren können. Dies ermutigt zu Anwendungen des Tissue engineering mit MSC bei chondralen Defekten, da die natürliche Umgebung im Gelenk der chondrogenen Differenzierung förderlich ist.

Schlagworte: Mesenchymale Stammzellen, Hyaluronsäure, Synovialflüssigkeit, Chondrogenese.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) have the potential to differentiate into distinct mesenchymal tissues including cartilage, which suggests these cells as an attractive cell source for cartilage tissue engineering approaches. Our objective was to study the effects of TGF- β 1, hyaluronic acid (HA) and synovial fluid (SF) on chondrogenic differentiation of equine MSC in high-density-3D-cultures as well as in bioresorbable polymer fleece.

For that objective, bone marrow was aspirated from the tibia of two 18-month-old horses (Haflinger) and MSC were isolated using percoll-density centrifugation. To promote chondrogenesis in high-density-3D-cultures, MSC were centrifuged to form a micromass and were cultured in a medium containing 10 ng/ml TGF- β 1 or 0.1 mg/ml HA (Hylartil®, Ostenil®), or either 5%, 10% or 50% autologous SF, as the chondrogenesis inducing factor. In the bioresorbable polymer fleece either 10 ng/ml TGF- β 1 or 5% autologous SF were used as the chondrogenesis inducing factor.

Differentiation along the chondrogenic lineage was documented by type II collagen and proteoglycan expression. In high-density-3D-cultures, MSC induced by TGF- β 1 alone showed the highest proteoglycan expression. Combining TGF- β 1 with HA could not increase the proteoglycan expression. Cultures stimulated by autologous SF (independent of concentration) or HA demonstrated a pronounced, but lower proteoglycan expression than cultures stimulated by TGF- β 1. The expression of cartilage-specific type II collagen was high and nearly the same in all stimulated cultures. In the bioresorbable polymer fleece, MSC induced either with TGF- β 1 or autologous SF showed the ability to produce extracellular matrix, rich in proteoglycans, resulting in a stiff, cartilage-like fleece-cell integrate. MSC induced with autologous SF showed a more homogeneous distribution of cells and extracellular matrix within the fleece than when induced with TGF- β 1, where cells and extracellular matrix were found more on the surface area of the fleece.

In summary, HA and autologous SF induce chondrogenesis of equine MSC, which strongly suggests tissue engineering applications of MSC in chondral defects, as the natural environment in the joint is favorable for chondrogenic differentiation.

Keywords: Mesenchymal stem cells, hyaluronic acid, synovial fluid, chondrogenesis.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Die außerordentliche Druckfestigkeit hyalinen Knorpels entsteht durch das zugfeste Kollagenfasernetzwerk und dem osmotisch stark wirksamen an Hyaluronsäure gekoppelten Proteoglycan (Hardingham, 1998). _____ 11
- Abb. 2:** Zonen des Gelenkknorpels im Querschnitt nach Buckwalter: Zone I (Tangentialfaserzone), Zone II (Übergangszone), Zone III (Radiärzone), Zone IV (Zone des mineralisierten Knorpels). Die gestrichelten Linien zeigen den arkadenartigen Verlauf der Kollagenfasern. Die Chondrozyten sind entlang dieser Fasern in den einzelnen Schichten ausgerichtet (Buckwalter und Mankin, 1998). _____ 12
- Abb. 3:** Implantation eines Knorpel-Knochenzylinders mittels Transferhülse (links); Operationsresultat vor Implantation des letzten Autografts in die Belastungszone (rechts). _____ 18
- Abb. 4:** Allgemeine Prozedur beim Tissue Engineering (Ringe et al., 2002). _____ 19
- Abb. 5:** Unterspritzung des aufgenähten Periostlappens mit autologen Chondrozyten (links); mit autologen Chondrozyten beladenes bioresorbierbares Polymer-Vlies (BioSeed-C®), (rechts). _____ 20
- Abb. 6:** Differenzierungspotential von MSC zu mesenchymalen Geweben. Gezeigt werden einige Kulturbedingungen (grau), die den Differenzierungsprozess entlang einer bestimmten Zelllinie anstoßen (schwarze Pfeile). Wichtige bekannte Signalketten, Komponenten und Ereignisse, die sich dabei entwickeln, sind kursiv unterlegt. Phänomene der Konversion, wie z.B. die Neurogenese werden sehr kontrovers diskutiert (Otto und Rao, 2004; Barry und Murphy, 2004; Tuan, 2004). _____ 28
- Abb. 7:** Modeldarstellung der Differenzierung von MSC nach Baksh et al., 2004: Bevor MSC einen spezifischen Phänotyp ausprägen, durchlaufen sie zwei Ebenen. Eins im „stem cell compartment“, das Andere im „committed cell compartment“. Im „stem cell compartment“ kommt es durch asymmetrische Zellteilung (A) zu einer weniger potenten Zellpopulation. Diese führt in Form symmetrischer Zellteilung (S) zu Vorläuferzellen mit vergleichsweise eingeschränktem Differenzierungs- und Erneuerungspotential. Diese tri- oder bipotenten Zellen teilen sich weiter symmetrisch zu bi- und unipotenten Vorläuferzellen im „committed cell compartment“ und entwickeln voll differenzierte Zellen. Es zeichnet sich ab, dass voll differenzierte Zellen wieder zu multipotenten Zellen dedifferenzieren können und sich unter geeigneten Bedingungen entlang einer anderen Zelllinie differenzieren können (offene Pfeile). _____ 30
- Abb. 8:** Venn-Diagramm, das die Anzahl der Gene illustriert, welche bei Chondrogenese, Adipogenese und Osteogenese von MSC spezifisch oder gemeinsam hoch reguliert werden (Baksh et al., 2004). _____ 31
- Abb. 9:** Chemische Struktur der Hyaluronsäure. _____ 35
- Abb. 10:** Übersicht des Studiendesigns. Für die hochdichten 3D-Kulturen wurden ausschließlich Zellen von Pferd 1 genutzt - für die Polymer-Vliese ausschließlich Zellen von Pferd 2. _____ 39
- Abb. 11:** Phasenkontrast-Photomikrographien equiner mesenchymaler Stammzellen (MSC) in Kulturflaschen. Aus Pferde-Knochenmark gewonnene Zellen wurden in Kultur gebracht und bestanden hauptsächlich aus runden Erythrocyten und nicht adhären wachsenden hämatopoetischen Zellen. (A) Am achten Tag haben sich equine MSC fibroblastischer Morphologie am Boden der Kulturflasche ausgebreitet, vermehrt und wirbelförmig angeordnet. (B) Subkultivierte equine MSC der zweiten Passage präsentierten sich weiter in stabiler fibroblastischer Morphologie und wurden für die Versuche der chondrogenen Differenzierung genutzt. _____ 53

Abb. 12: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von nativem equinen Knorpel. (A-B) Eine deutlich positive Alcianblau-Färbung weist die Proteoglycane der Extrazellulär-Matrix nach. (C-D) Die monoklonale Antikörper-Färbung für Kollagen Typ II ist auch positiv. Die unregelmäßigen Farbtintensitäten lassen sich durch die Maskierung der Kollagenfasern im nativen Knorpel erklären, die man mittels Hyaluronidasen- und Kollagenasenbehandlung vor dem Färben versucht zu beseitigen. _____ 54

Abb. 13: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur. Exemplarische Übersicht zur Lokalisation von (A,D,G) Proteoglycanen, (B,E,H) Kollagen Typ II und (C,F,I) Kollagen Typ I mit den Differenzierungsfaktoren (ABC) Hyaluronsäure (Hylartil), (D,E,F) Hyaluronsäure (Hylartil) in Kombination mit TGF- β 1 und (G,H,I) Synovialflüssigkeit. An diesen Beispielen wird besonders deutlich, dass Proteoglycan und Kollagen Typ II tendenziell mehr im Zentrum konzentriert ist, während das bindegewebstypische Kollagen Typ I mehr in den Randbereichen der Pellets lokalisiert ist. _____ 55

Abb. 14: Quantitative Expression Alcianblau gefärbter Proteoglycane im Verhältnis zum Gesamt-Pellet in chondrogen induzierten MSC der zweiten Passage am 26. Tag Pellet-Kultur. Die Analyse wurde mittels der Software Adobe Photoshop® durchgeführt. Dabei wurden die Alcianblau gefärbten Pixel prozentual mit dem Gesamt-Pellet ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass TGF- β 1 im Verhältnis zum Gesamt-Pellet die stärkste Proteoglycan-Expression induziert hat. Im Kontroll-Pellet war sie dagegen sehr niedrig (<1%). _____ 56

Abb. 15: Nährungsweise Bestimmung der Pelletgröße in chondrogen induzierten MSC der zweiten Passage am 26. Tag Pellet-Kultur. Die Analyse wurde mittels der Software Adobe Photoshop® durchgeführt. Dabei wurden die Pixel der Pelletschnitte ausgezählt und gemittelt. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Größenzunahme der induzierten Pellets gegenüber den Kontrollen. _____ 57

Abb. 16: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur. (A) Hochdichte 3D-Kulturen der Kontrollgruppe zeigen keine Proteoglycan-Expression. (B) Eine Expression des knorpelspezifischen Kollagen Typ II hat in den Kontroll-Pellets nicht stattgefunden, wie die negative monoklonale Antikörper-Färbung zeigt. (C) Bei mit 10 ng/ml TGF- β 1 induzierten hochdichten 3D-Kulturen ist eine deutliche Proteoglycan- und (D) Kollagenexpression zu beobachten. _____ 58

Abb. 17: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur mit Hyaluronsäuren als Differenzierungsfaktoren. (A) Bei 0,1 mg/ml der Hyaluronsäure Hylartil® zeigt sich hier eine deutliche Proteoglycan-Expression in der Alcianblau-Färbung, sowie eine (B) Expression des knorpelspezifischen Kollagen Typ II, erkennbar an der deutlich positiven monoklonalen Antikörper-Färbung. (C,D) Mit 0,1 mg/ml der Hyaluronsäure Ostenil® induzierte hochdichte 3D-Kulturen zeigen ein ähnliches Verhalten. _____ 59

Abb. 18: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur mit Kombinationen von TGF- β 1 und Hyaluronsäuren als Differenzierungsfaktoren. (A) Die Kombination von 0,1 mg/ml der Hyaluronsäure Hylartil® mit 10 ng/ml TGF- β 1 führt zu einer starken Proteoglycan-Expression in der Alcianblau-Färbung, sowie zu einer (B) deutlichen Expression des knorpelspezifischen Kollagen Typ II, erkennbar an der positiven monoklonalen Antikörper-Färbung. (C,D) Die Kombination von 0,1 mg/ml der Hyaluronsäure Ostenil® mit 10 ng/ml TGF- β 1 zeigt ein ähnliches Ergebnis. _____ 60

Abb. 19: Digitale Photomikrographien histochemischer Analysen von equinen MSC der Passage 2 am 26. Tag Pellet-Kultur mit autologer Synovialflüssigkeit als Differenzierungsfaktor. (A,C,E) Unabhängig der Konzentration an Synovialflüssigkeit (5%, 10%, 50%) im Medium zeigten alle hochdichten 3D-Kulturen eine starke Proteoglycan-

Expression anhand der Alcianblau-Färbung, (B,D,F) sowie eine starke Kollagen Typ II Expression mittels monoklonaler Antikörper-Färbung. _____ 61

Abb. 20: Photomikrographien von Vliesen am 26. Kulturtag, die mit MSC der zweiten Passage besiedelt wurden. (A) In den Kontroll-Vliesen sieht man nur eine schwache zelluläre Besiedlung und Bildung extrazellulärer Matrix (braune flächige Strukturen). Die Vlies-Fasern sind noch deutlich erkennbar und es existiert keine klare glatte Abgrenzung der Vliese nach außen hin. (B) Hier wurden die MSC mit 10 ng/ml TGF- β 1 induziert. Im Vergleich zur Kontrolle hat hier eine deutlich stärkere zelluläre Besiedlung und Bildung extrazellulärer Matrix stattgefunden. Vlies-Fasern sind zum Teil noch erkennbar, eine glatte Abgrenzung nach außen teilweise vorhanden. (C) Bei Induktion der MSC mit 5% Synovialflüssigkeit findet sich eine fast homogene Vliesfläche, die sich klar glatt nach außen abgrenzt. Dies spricht für eine starke zelluläre Besiedlung mit reichlicher Bildung extrazellulärer Matrix. 64

Abb. 21: Digitale Photomikrographien von einem Kontroll-Vlies am 26. Kulturtag, das mit equinen MSC der Passage 2 besiedelt wurde. (A,B,C) In der Alcianblau-Färbung stellen sich die Vlies-Fasern dunkelblau dar. Eine schwache Besiedlung in Randbereichen des Vlies hat stattgefunden, jedoch keine Proteoglycan-Expression. (D) Die monoklonalen Antikörper-Färbungen für Kollagen Typ II und E) Kollagen Typ I sind negativ. _____ 66

Abb. 22: Digitale Photomikrographien von einem Vlies am 26 Kulturtag, das unter dem Differenzierungsfaktor 10 ng/ml TGF- β 1 mit equinen MSC der Passage 2 besiedelt wurde. In der Alcianblau-Färbung stellen sich die Vlies-Fasern dunkelblau dar. (A,B,C) In den Alcianblau-Färbungen zeigt sich eine ausgeprägte Proteoglycansekretion in den Zellauflagerungen am Vlies. Im Vlies selbst allerdings nur schwach in den Randbereichen. (D) In dieser Alcianblau-Färbung wird die ähnliche Morphologie zum nativen Knorpel deutlich. (E) Die monoklonalen Antikörper-Färbungen für Kollagen Typ II und E) Kollagen Typ I sind negativ. _____ 67

Abb. 23: Digitale Photomikrographien von einem Vlies am 26 Kulturtag, das unter dem Differenzierungsfaktor 10 ng/ml TGF- β 1 mit equinen MSC der Passage 2 besiedelt wurde. In der Alcianblau-Färbung stellen sich die Vlies-Fasern dunkelblau dar. (A,B,C) In den Alcianblau-Färbungen zeigt sich eine ausgeprägte Proteoglycansekretion in den Zellauflagerungen am Vlies. Im Vlies selbst allerdings nur schwach in den Randbereichen. (D) In dieser Alcianblau-Färbung wird die ähnliche Morphologie zum nativen Knorpel deutlich. (E) Die monoklonalen Antikörper-Färbungen für Kollagen Typ II und E) Kollagen Typ I sind negativ. _____ 68

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zelleigenschaften humaner MSC aus repräsentativen Studien. _____	26
Tab. 2: Therapeutischer Einsatz mesenchymaler Vorläuferzellen. _____	33
Tab. 3: Versuchsanordnung der hochdichten 3D-Kulturen. _____	49
Tab. 4: Versuchsanordnung der 3D-Vlies-Kulturen. _____	50

Curriculum vitae

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

PUBLIKATIONEN

Hegewald A. A., Ringe J., Bartel J., Krüger I., Notter M., Barnewitz D., Kaps C., Sittinger M.,

Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study, Tissue Cell. 2004 Dec; 36(6): 431-8.

Hegewald A. A., Schmitt B., Ringe J., Bartel J., Notter M., Barnewitz D., Kaps C., Sittinger M.,

Adult mesenchymal stem and progenitor cells: effect of synovial fluid and hyaluronic acid on chondrogenesis, Zeitschrift für Rheumatologie 61, Suppl. 1, 128-129, Kongress der DGRH, Berlin, Oktober 2002.

Hegewald A. A., Bartel J., Ringe J., Krüger I., Kaps C., Sittinger M.,

Equine mesenchymal stem and precursor cells: differentiation into bone and cartilage for tissue engineering applications, Tissue Engineering 7, 668, 1st Biennial Meeting of ETES, Freiburg, November 2001.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Erklärung

„Ich, Aldemar Andres Hegewald, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Chondrogenes Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen in hochdichten 3D-Kulturen und im bioresorbierbaren Polymer-Vlies selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Mannheim, den 01.09.2006