

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and
enhance skeletal muscle regeneration

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. univ. Matthias Pumberger

aus Wien

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (Deutsch).....	1
Abstrakt (Englisch).....	3
Eidesstattliche Versicherung.....	4
Anteilerklärung der Publikation.....	5
Journal Summary List (ISI Web of Knowledge).....	6
Publikation	8
Lebenslauf.....	22
Publikationsliste	23
Danksagung.....	27

Abstrakt (Deutsch)

Funktionelle Defizite der Skelettmuskulatur werden durch eine insuffiziente Regeneration verursacht und sind weiterhin von besonderer Bedeutung im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie. Sollte das intrinsische Regenerationspotential nicht ausreichen, kommt es zur akontraktiven Vernarbung der Muskulatur. Um das Regenerationspotential zu steigern stellte sich in den letzten Jahren die künstliche Gewebewiederherstellung am vielversprechendsten dar. In Vorarbeiten konnten bereits mesenchymalen Stammzellen (MSCs) in einem Skelttmuskeltraumamodell der Ratte evaluiert werden und zeigten eine Steigerung der Muskelkraft. Obwohl die Überlebensrate der MSCs im post-traumatischen Areal durch das pro-inflammatorischen Milieu deutlich eingeschränkt ist, kommt es zu einer parakrinen Stimulation des nativen Skelettmuskelgewebes. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass das endogene Potential von MSCs durch die Transplantation in einem geschützten Biomaterial gesteigert werden kann. Die Effektivität der transplantierten MSCs in einem Biomaterial könnte zusätzlich durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden.

Die autolog gewonnen MSCs wurden für in-vitro und in-vivo Versuche kultiviert. Um den parakrinen Effekt zu analysieren, wurden Experimente mit konditioniertem Medium hinsichtlich der Apoptose, Migration und Differenzierung durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde das Biomaterial (Hydrogel, Alginat) mit MSCs besiedelt und die Vitalität beziehungsweise das Migrationsverhalten überprüft. Das Proteinsekretionsprofil wurde analysiert um die optimale MSC Stimulation mittels Wachstumsfaktoren zu bestimmen. In vivo wurde das Hydrogel in unterschiedlichen Kombinationen mit Wachstumsfaktoren und MSCs in einem Skelettmuskeltraumamodell der Ratte getestet. Hierfür wurde vor der Transplantation der Musculus Soleus unilateral traumatisiert. Die Muskelkraft und histologische Färbungen, im Speziellen zur Bestimmung der Muskelfaserdichte, regenerierender Muskelfaser, Fibrosierung und der Gefäßdichte wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Die Ergebnisse wurden intra-individuell zur Gegenseite normalisiert und die Versuchsgruppen miteinander verglichen.

Die in-vitro Ergebnisse zeigen eine erfolgreiche Isolation der autologen MSCs. Das Hydrogel konnte mit MSCs besiedelt werden und ein signifikanter Einfluss auf das native Gewebe mittels erhöhter Überlebensrate, Reduktion der Apoptose und vermehrter Migration zum traumatisiertem Areal dargelegt werden. Dieser parakrine Effekt konnte durch eine zusätzliche Stimulation der MSCs mit Wachstumsfaktoren gesteigert werden. Die in-vivo Ergebnisse zeigten eine signifikante Steigerung der Muskelkraft in der MSC-Wachstumsfaktor Gruppe. Die histologischen Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse durch eine Reduktion der Fibrosierung, erhöhte Anzahl der regenerierenden Muskelfasern und eine verbesserte Durchblutung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass das endogene Regenerationspotential von MSCs durch eine Stimulierung mittels Wachstumsfaktoren gesteigert werden kann. Eine Transplantation der MSCs in einem Hydrogel mit zusätzlichen Wachstumsfaktoren führt zu einer gesteigerten Muskelkraft durch eine vermehrte Regeneration der Muskelfasern und einer Reduktion der Narbenbildung.

Abstrakt (Englisch)

In the field of orthopedic surgery, functional deficits of skeletal muscles is due to insufficient regeneration a remaining challenge. If the muscle trauma outbalances the intrinsic regenerative potential, it leads to scar formation. In the past decades, tissue engineering has been identified as the most promising approach to enhance the regenerative potential. In previous publications, mesenchymal stem cells (MSCs) were evaluated in a clinically relevant trauma model and lead to a significant improvement of muscle force. Although the survival rate of transplanted MSCs at the post-traumatic site is due to the pro-inflammatory surrounding rather low, the paracrine signaling stimulates the native tissue. The hypothesis of this work was to protect the MSCs by transplanting the cells encapsulated in a hydrogel. The endogenous potential of MSCs could be further enhanced due to growth factor stimulation.

Autologous harvested MSCs were seeded in cellular culture and prepared for further in-vitro and in-vivo analysis. To evaluate the paracrine effect, conditioned-media experiments regarding apoptosis, migration and differentiation assays were performed. In the following step, cells were seeded on the biomaterial (hydrogel, alginate) and viability as well as outward migration analyzed. The protein secretion profile was studied in order to identify the most potent stimulus through growth factors. In vivo, the hydrogel, in various combinations of growth factors and MSCs, was evaluated in a skeletal muscle trauma model of the rat. Therefore the soleus muscle was unilaterally traumatized. Muscle force measurements and histological analysis, regarding muscle fiber count, regenerating fibers, fibrotic area and vasculature were performed. The results of all groups at different follow-up time points were compared after intra-individual normalization to the contralateral side.

In-vitro results showed a successful isolation of autologous MSCs. The cells were encapsulated in the hydrogel and showed a significant influence on the native tissue response regarding increased survival rate, reduction of apoptosis and increased migration. The paracrine effect of encapsulated MSCs could be further enhanced due to growth factor stimulation. In-vivo results demonstrated a significant increase of muscle force in the MSC-growth factor group. Histological analysis confirmed these results by a reduction of fibrosis, increased number of regenerating fibers and increased vascular supply.

In summary, the endogenous regenerative potential of MSCs can be successfully stimulated by growth factors. Transplantation of MSCs encapsulated in a hydrogel with growth factors lead to a significant increase in muscle force due to an increased in regenerating fibers and reduction of fibrosis.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Matthias Pumberger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

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

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Autoren: Matthias Pumberger, Taimoor Qazi, Christine Ehrentraut, Martin Textor, Janina Kueper, Gisela Stoltenburg-Didinger, Tobias Winkler, Philipp von Roth, Simon Reinke, Cristina Borselli, Carsten Perka, David J. Mooney, Georg N. Duda, Sven Geißler

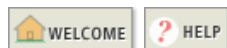
Titel: Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration

Fachzeitschrift: Biomaterials, 2016

Beitrag im Einzelnen:

Die Konzeption der Studie als auch die zeitliche Planung wurden von mir entworfen. Die Publikationen der beiden kooperierenden Arbeitsgruppen (Wyss Institute, Harvard University, Boston, USA und Julius-Wolff-Institut, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland) studierte ich hierfür ausführlich und konnte somit in Zusammenarbeit mit Univ.-Prof. Carsten Perka, Univ.-Prof. Georg Duda und Prof. Mooney das Studiendesign erstellen. Das entworfene Konzept wurde bei der Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies eingereicht und die Studie im Rahmen des Clinical Scientist Programms durchgeführt. Während dieser Forschungsperiode wurde zuerst die Zellkultur der autologen MSCs von mir etabliert. Die Datenakquisition der in-vitro als auch der in-vivo Ergebnisse wurde durch mich durchgeführt. Im Speziellen ist hervorzuheben, dass jede Knochenmarksbiopsie, Muskeltraumatisierung als auch Muskelkraftmessung und Explantation zur histologischen Analyse (ca. 240 Ratten) von mir durchgeführt wurde. Es erfolgte von mir die Etablierung der histologischen Färbungen. Die Datenanalyse und Interpretation wurde in Zusammenarbeit mit dem Seniorautor Sven Geißler durchgeführt. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von mir erstellt und von allen Koautoren korrigiert – die Korrekturen wurden vor der Einreichung eingefügt. Die finale Freigabe des Manuskripts wurde von mir und dem Seniorautor erteilt.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin



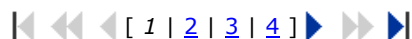
Journal Summary List

[Journal Title Changes](#)

 Journals from: **subject categories ENGINEERING, BIOMEDICAL** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

 Sorted by:

Journals 1 - 20 (of 76)



Page 1 of 4

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ⁱ						Eigenfactor [®] Metrics ⁱ	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
<input type="checkbox"/>	1	ANNU REV BIOMED ENG	1523-9829	3823	10.256	14.137	0.412	17	8.3	0.00647	4.498
<input type="checkbox"/>	2	BIOMATERIALS	0142-9612	95025	8.387	8.978	1.683	757	6.4	0.14892	2.025
<input type="checkbox"/>	3	ACTA BIOMATER	1742-7061	20966	6.008	6.383	1.208	504	4.3	0.05394	1.462
<input type="checkbox"/>	4	ADV HEALTHC MATER	2192-2640	3173	5.760	6.019	1.050	262	2.2	0.01135	1.562
<input type="checkbox"/>	5	J TISSUE ENG REGEN M	1932-6254	2862	4.710	4.103	0.606	160	3.8	0.00729	0.991
<input type="checkbox"/>	6	BIOFABRICATION	1758-5082	1216	4.702	5.032	0.789	57	2.9	0.00382	1.167
<input type="checkbox"/>	7	MED IMAGE ANAL	1361-8415	4764	4.565	4.950	0.760	121	6.3	0.01072	1.624
<input type="checkbox"/>	8	IEEE T MED IMAGING	0278-0062	13784	3.756	4.720	0.779	213	9.5	0.02450	1.781
<input type="checkbox"/>	9	EUR CELLS MATER	1473-2262	2798	3.654	5.202	0.653	49	5.1	0.00678	1.395
<input type="checkbox"/>	10	J NEURAL ENG	1741-2560	3789	3.493	3.859	0.654	104	4.6	0.01349	1.409
<input type="checkbox"/>	11	CLIN ORAL IMPLAN RES	0905-7161	11968	3.464	4.522	0.619	236	7.2	0.01661	1.095
<input type="checkbox"/>	12	BIOMED MATER	1748-6041	2230	3.361	3.132	0.338	133	5.1	0.00419	0.686
<input type="checkbox"/>	13	J BIOMED MATER RES A	1549-3296	15442	3.263	3.196	0.819	393	6.4	0.02366	0.733
<input type="checkbox"/>	14	BIOMECH MODEL MECHAN	1617-7959	1975	3.032	3.149	0.521	96	4.2	0.00655	1.041
<input type="checkbox"/>	15	ORGANOGENESIS	1547-6278	742	2.910	3.324	0.091	11	5.3	0.00245	1.093
<input type="checkbox"/>	16	ANN BIOMED ENG	0090-6964	8405	2.887	3.038	0.582	244	6.8	0.01771	0.968
<input type="checkbox"/>	17	J BIOMED MATER RES B	1552-4973	7100	2.881	2.850	0.711	180	6.5	0.01077	0.685
<input type="checkbox"/>	18	J MECH BEHAV BIOMED	1751-6161	4277	2.876	3.152	0.565	285	3.3	0.01469	0.862
<input type="checkbox"/>	19	PHYS MED BIOL	0031-9155	21090	2.811	3.051	0.542	555	7.5	0.03988	1.012
<input type="checkbox"/>	20	REGEN MED	1746-0751	1496	2.602	3.336	0.803	61	5.0	0.00388	0.916

[Acceptable Use Policy](#)
Copyright © 2016 [Thomson Reuters](#).



THOMSON REUTERS

Published by Thomson Reuters

Pumberger M, Qazi TH, Ehrentraut MC, Textor M, Kueper J, Stoltenburg-Didinger G, Winkler T, von Roth P, Reinke S, Borselli C, Perka C, Mooney DJ, Duda GN, Geißler S.

Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration. *Biomaterials*. 2016 Aug;99:95-108.

Link zum Dokument: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.009>

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

Publikationsliste

Publikationen von Matthias Pumberger PubMed gelisteter Zeitschriften mit Peer-Review in chronologischer Reihenfolge (Stand August 2016)

Anzahl	30
davon Erst- oder Letztautorenschaften	11
Summe Impact Faktoren	73,5
Durchschnitt Impact Faktoren	2,4

1. Fuchs M, Putzier M, **Pumberger M**, Hermann KG, Diekhoff T.
Acute vertebral fracture after spinal fusion: a case report illustrating the added value of single-source dual-energy computed tomography to magnetic resonance imaging in a patient with spinal instrumentation.
Skeletal Radiol. 2016 Sep;45(9):1303-6.
IF: 1,527
2. Putzier M, **Pumberger M**, Halm H, Zahn RK, Franke J.
Surgical treatment of de-novo scoliosis.
Orthopade. 2016 Aug
IF: 0,373
3. **Pumberger M**, Qazi TH, Ehrentraut MC, Textor M, Kueper J, Stoltenburg-Didinger G, Winkler T, von Roth P, Reinke S, Borselli C, Perka C, Mooney DJ, Duda GN, Geißler S.
Synthetic niche to modulate regenerative potential of MSCs and enhance skeletal muscle regeneration.
Biomaterials. 2016 Aug;99:95-108.
IF: 8,387
4. Burger D, **Pumberger M**, Fuchs B.
An Uncemented Spreading Stem for the Fixation in the Metaphyseal Femur: A Preliminary Report.
Sarcoma. 2016:7132838.
IF: 0,000
5. Putzier M, Groß C, Zahn RK, **Pumberger M**, Strube P.
Characteristics of neuromuscular scoliosis.
Orthopade. 2016 Jun;45(6):500-8.
IF: 0,373
6. Hoff EK, Strube P, **Pumberger M**, Zahn RK, Putzier M.
ALIF and total disc replacement versus 2-level circumferential fusion with TLIF: a prospective, randomized, clinical and radiological trial.
Eur Spine J. 2016 May;25(5):1558-66.
IF: 2,132

7. **Pumberger M**, Prasad V, Druschel C, Disch AC, Brenner W, Schaser KD.
Quantitative in vivo fusion assessment by (18)F-fluoride PET/CT following en bloc spondylectomy.
Eur Spine J. 2016 Mar;25(3):836-42.
IF: 2,132
8. **Pumberger M**, Druschel C, Disch AC.
Transposition of the vertebral artery after a unilateral c1 lateral mass fracture: a case report and review of the literature.
Clin J Sport Med. 2015 May;25(3):e59-61.
IF: 2,308
9. Qazi TH, Mooney DJ, **Pumberger M**, Geissler S, Duda GN.
Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: existing technologies and future trends.
Biomaterials. 2015 Mar;53:502-21.
IF: 8,387
10. Ortmaier R, Mattiassich G, **Pumberger M**, Hitzl W, Moroder P, Auffarth A, Resch H.
Comparison between reverse shoulder arthroplasty and Humerusblock in three- and four-part proximal humerus fractures in elderly patients.
Int Orthop. 2015 Feb;39(2):335-42.
IF: 2,387
11. Gausden EB, Sama AA, Taher F, **Pumberger M**, Cammisa FP, Hughes AP.
Long-term sequelae of patients with retained drains in spine surgery.
J Spinal Disord Tech. 2015 Feb;28(1):37-9.
IF: 2,291
12. Ostermann RC, Hofbauer M, Tiefenböck T, **Pumberger M**, Tiefenböck M, Platzer P, Aldrian S.
Injury severity in ice skating: an epidemiologic analysis using a standardised injury classification system.
Int Orthop. 2015 Jan;39(1):119-24.
IF: 2,387
13. **Pumberger M**, Memtsoudis SG, Stundner O, Herzog R, Boettner F, Gausden E, Hughes AP.
An analysis of the safety of epidural and spinal neuraxial anesthesia in more than 100,000 consecutive major lower extremity joint replacements.
Reg Anesth Pain Med. 2013 Nov-Dec;38(6):515-9.
IF: 2,120
14. Taher F, Hughes AP, Lebl DR, Sama AA, **Pumberger M**, Huang RC, Cammisa FP, Girardi FP.
Contralateral motor deficits after lateral lumbar interbody fusion.
Spine (Phila Pa 1976). 2013 Oct 15;38(22):1959-63.
IF: 2,447

15. Druschel C, Disch AC, **Pumberger M**, Schwabe P, Melcher I, Haas NP, Schaser KD.
Solitary spinal metastases. Is aggressive surgical management justified?
Orthopade. 2013 Sep;42(9):709-24.
IF: 0,665
16. Lebl DR, Sama AA, **Pumberger M**, Kotwal S, Cammisa FP Jr, Girardi FP.
Reamed transacral interbody fusion for L5-s1 pseudoarthrosis: a novel salvage technique in 10 patients.
J Spinal Disord Tech. 2013 Aug;26(6):334-41.
IF: 1,888
17. **Pumberger M**, Froemel D, Aichmair A, Hughes AP, Sama AA, Cammisa FP, Girardi FP.
Clinical predictors of surgical outcome in cervical spondylotic myelopathy: an analysis of 248 patients.
Bone Joint J. 2013 Jul;95-B(7):966-71.
IF: 2,801
18. **Pumberger M**, Hughes AP, Girardi FP, Gogia J, Kotwal SY, Thaler C, Sama AA.
Influence of surgical experience on the efficiency of discectomy in TLIF: a cadaveric testing in 40 levels.
J Spinal Disord Tech. 2012 Dec;25(8):E254-8.
IF: 1,767
19. Memtsoudis SG, **Pumberger M**, Ma Y, Chiu YL, Fritsch G, Gerner P, Poultides L, Valle AG.
Epidemiology and risk factors for perioperative mortality after total hip and knee arthroplasty.
J Orthop Res. 2012 Nov;30(11):1811-21.
IF: 2,875
20. **Pumberger M**, Chiu YL, Ma Y, Girardi FP, Vougioukas V, Memtsoudis SG.
Perioperative mortality after lumbar spinal fusion surgery: an analysis of epidemiology and risk factors.
Eur Spine J. 2012 Aug;21(8):1633-9.
IF: 2,133
21. Disch AC, **Pumberger M**, Schmoelz W, Melcher I, Druschel C, Schaser KD.
Biomechanical aspects of complex reconstructions following radical resection of thoracolumbar spinal tumors.
Orthopade. 2012 Aug;41(8):647-58.
IF: 0,506
22. Issack PS, Cunningham ME, **Pumberger M**, Hughes AP, Cammisa FP Jr.
Degenerative lumbar spinal stenosis: evaluation and management.
J Am Acad Orthop Surg. 2012 Aug;20(8):527-35.
IF: 2,455

-
23. **Pumberger M**, Hughes AP, Huang RR, Sama AA, Cammisa FP, Girardi FP.
Neurologic deficit following lateral lumbar interbody fusion.
Eur Spine J. 2012 Jun;21(6):1192-9.
IF: 2,133
24. Memtsoudis SG, Kirksey M, Ma Y, Chiu YL, Mazumdar M, **Pumberger M**, Girardi FP.
Metabolic syndrome and lumbar spine fusion surgery: epidemiology and perioperative outcomes.
Spine (Phila Pa 1976). 2012 May 15;37(11):989-95.
IF: 2,159
25. **Pumberger M**, Chiu YL, Ma Y, Girardi FP, Mazumdar M, Memtsoudis SG.
National in-hospital morbidity and mortality trends after lumbar fusion surgery between 1998 and 2008.
J Bone Joint Surg Br. 2012 Mar;94(3):359-64.
IF: 2,735
26. **Pumberger M**, Gogia J, Hughes AP, Kotwal SY, Girardi FP, Sama AA.
Conventional manual discectomy versus powered discectomy for interbody fusion in the lumbar spine: cadaveric testing in forty levels.
J Spinal Disord Tech. 2011 Dec;24(8):E71-4.
IF: 1,503
27. Caridi JM, **Pumberger M**, Hughes AP.
Cervical radiculopathy: a review.
HSS J. 2011 Oct;7(3):265-72.
IF: 0,000
28. Kotwal S, **Pumberger M**, Hughes A, Girardi F.
Degenerative scoliosis: a review.
HSS J. 2011 Oct;7(3):257-64.
IF: 0,000
29. Dadsetan M, **Pumberger M**, Casper ME, Shogren K, Giuliani M, Ruesink T, Hefferan TE, Currier BL, Yaszemski MJ.
The effects of fixed electrical charge on chondrocyte behavior.
Acta Biomater. 2011 May;7(5):2080-90.
IF: 4,865
30. Dadsetan M, Liu Z, **Pumberger M**, Giraldo CV, Ruesink T, Lu L, Yaszemski MJ.
A stimuli-responsive hydrogel for doxorubicin delivery.
Biomaterials. 2010 Nov;31(31):8051-62.
IF: 7,883

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Univ.-Prof. Dr. Carsten Perka, für die Betreuung dieser Arbeit und der äußerst freundlichen und zielorientierten Unterstützung der klinischen als auch akademischen Ausbildung. Ganz besonders möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Julius Wolff Institut, im Speziellen, Univ.-Prof. Dr. Georg Duda, Dr. Sven Geißler und Taimoor Qazi, M.Sc. für die Vielzahl konstruktiver Diskussionen und den enormen Einsatz bedanken.

Ich bedanke mich bei Prof. Mooney für die auf persönlicher und intellektueller Ebene bereichernden Gespräche. Herrn PD Dr. Tobias Winkler und PD Dr. Philipp von Roth danke ich für jede erdenkliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Diese Arbeit widme ich meiner Verlobten, Johanna Rohrer, und unserer gemeinsamen Tochter Lina. Eure andauernde Geduld und Hingabe hat diese Arbeit erst möglich gemacht.