

Aus der Anatomischen Anstalt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl II - Neuroanatomie
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz

Die Ausschüttung autokriner und parakriner
stemness-Faktoren durch humane
mesenchymale Stammzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Carola Wehling
aus München

2016

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Milz

Mitberichterstatter:
Priv. Doz. Dr. Florian Haasters
Priv. Doz. Dr. Dorit Nägler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2016

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Tissue Engineering und Regenerative Medizin.....	1
1.2 Tissue Engineering mit Stammzellen	2
1.3 Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	4
1.4 Die Rolle Dexamethasons bei der MSC-Differenzierung und dessen Relation zur <i>stemness</i>	10
1.5 Fragestellung.....	11
2 Methoden	13
2.1 Zellbiologische Methoden.....	13
2.1.1 MSC Isolierung aus humanem Knochenmark (hBMSC).....	14
2.1.2 Zellkultur.....	15
2.1.3 Konzentrierung und partielle Reinigung des konditionierten Mediums.....	16
2.1.4 Bestimmung der Zellzahl	17
2.1.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	18
2.1.6 Zelldifferenzierung	18
2.2 Analysemethoden.....	21
2.2.1 Messung des DNA-Gehaltes der hBMSC-Monolayerkulturen	21
2.2.2 Analyse der Osteogenese	22
2.2.3 Analyse der Chondrogenese	25
2.2.4 Analyse der Adipogenese.....	26
2.3 Statistik	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Vorversuche.....	28
3.1.1 Der Effekt unbearbeiteten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Osteogenese der hBMSC	28
3.1.2 Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf das Zellüberleben der hBMSC unter osteoblastischen Kulturbedingungen.....	30
3.2 Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf Dexamethason- induzierte Dreilinien-Differenzierung der hBMSC	31

3.2.1	Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Osteogenese der hBMSC	32
3.2.2	Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Chondrogenese der hBMSC	36
3.2.3	Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Adipogenese der hBMSC.....	38
3.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	41
4	Diskussion	42
4.1	Die Bildung und Ausschüttung autokriner und parakriner <i>stemness</i> -Faktoren durch hBMSC	42
4.2	Die Identität der <i>stemness</i> -Faktoren der hBMSC	44
4.3	Die Effekte des Dexamethasons.....	45
4.4	Klinische Relevanz	46
4.5	Zukünftige Forschung	47
5	Zusammenfassung	49
6	Material	51
6.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	51
6.2	Chemikalien, Reagenzien und Puffer	52
6.3	Fertigkombinationen von Biochemikalien.....	54
6.4	Rekombinante Faktoren	54
6.5	Primer.....	54
6.6	Zelllinien.....	54
6.7	Medien	55
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	56
7.1	Abbildungen	56
7.2	Tabellen	57
8	Abkürzungsverzeichnis	58
9	Referenzen.....	60
10	Danksagung	68

1 Einleitung

1.1 Tissue Engineering und Regenerative Medizin

Menschliche Gewebe und Organe können sich nach Verletzung oder Krankheit in der Regel nur bedingt selbst reparieren. Eine vollständige Regeneration derselben aus sich selbst heraus ist meistens praktisch ausgeschlossen.

Das induzierte Wachstum von neuem Gewebe und neuen Organen ist in der Klinik eine zunehmend verwendete therapeutische Strategie, um die biologische Gewebe- und Organfunktion wiederherzustellen (Mason et al., 2008). Dieses Konzept hat die neuen, interdisziplinären Fachgebiete des Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin, oftmals insgesamt als TERM abgekürzt, hervorgebracht (Harrison et al., 2014).

Während Tissue Engineering im Allgemeinen die Entwicklung von neuem Gewebe *ex vivo* umfasst (Abbildung 1), ist die Geweberegeneration *in situ* der Weg der Regenerativen Medizin.

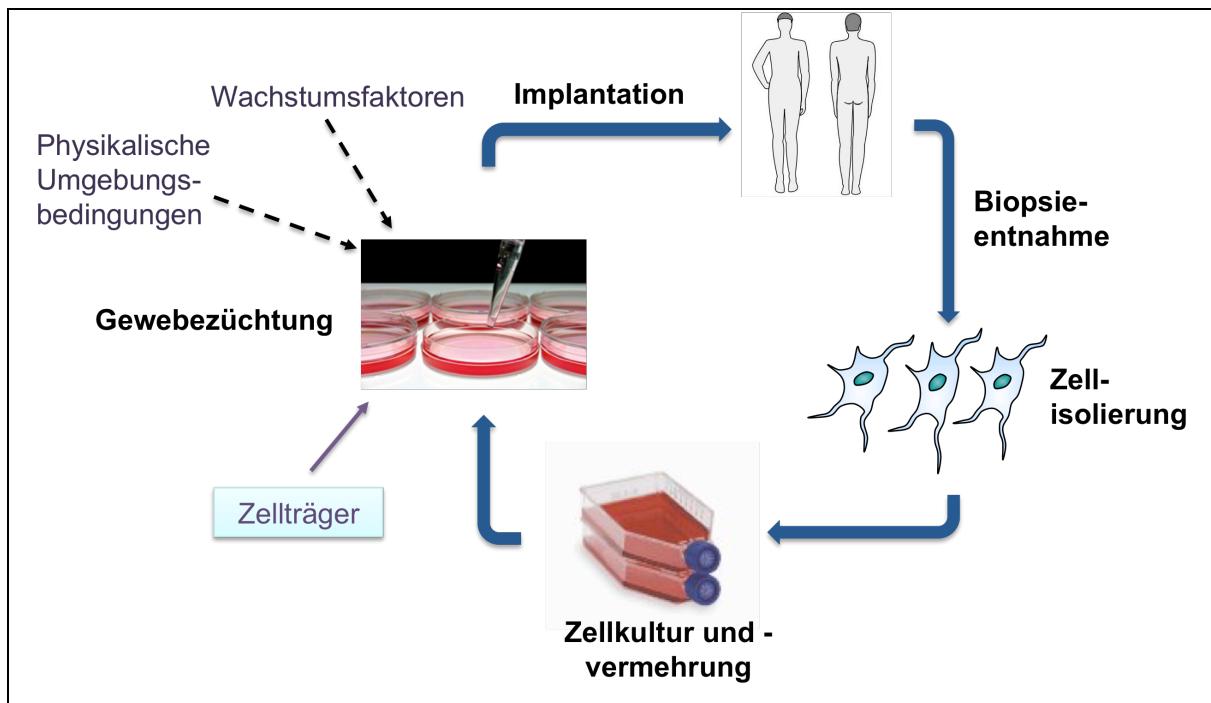


Abbildung 1: Die prinzipielle Idee des Tissue Engineering (modifiziert nach www.nature.com). Zellen werden aus dem Körper extrahiert, in Kultur angereichert, auf Zellträger angesetzt, der entsprechenden chemischen, physikalischen und biologischen Umgebung ausgesetzt und dem Patienten wieder reimplantiert.

Allerdings überschneiden sich beide Ansätze wesentlich und TERM setzt sich aus mindestens vier Schlüsselkomponenten zusammen:

1. Zellen, die das neue Gewebe bilden.
2. Biologische Signale, die für ein bestimmtes Zellverhalten sorgen.
3. Zellträger, die ein Trägergerüst bereitstellen, auf dem das neue Gewebe wächst.
4. Eine für das erwünschte Gewebe geeignete physikalische Umgebung.

Diese Komponenten überlappen sich teilweise ebenfalls. Die Zellen produzieren oft selbst die benötigten biologischen Signale. Hinzu kommt, dass auch Zellträger und physikalische Kräfte das Zellverhalten beeinflussen können.

Vorliegendes Forschungsprojekt befasst sich mit Stammzellen für ihre klinische Verwendung im interdisziplinären Bereich des TERM. Im Fokus der Untersuchungen steht das Verhalten von mesenchymalen Stammzellen (MSC) bei *in vitro* - Zellkultur und -differenzierung. Hierbei wird insbesondere auf die Reaktionen der MSC auf Moleküle, die sie produzieren und ausschütten, geschaut. Wie später in vorliegender Arbeit beschrieben, ist dies wichtig, weil die Bewahrung der MSC in ihrem undifferenzierten Status während der *ex vivo* -Manipulationen für das Tissue Engineering von besonderer Bedeutung ist.

1.2 Tissue Engineering mit Stammzellen

Charakteristisch für Stammzellen ist ihr Potenzial, sich selbst zu erneuern sowie ihre Fähigkeit, verschiedene Zelllinien zu generieren (Loeffler et al., 2002).

Wie Abbildung 2 aufzeigt, gibt es verschiedene Arten von Stammzellen.

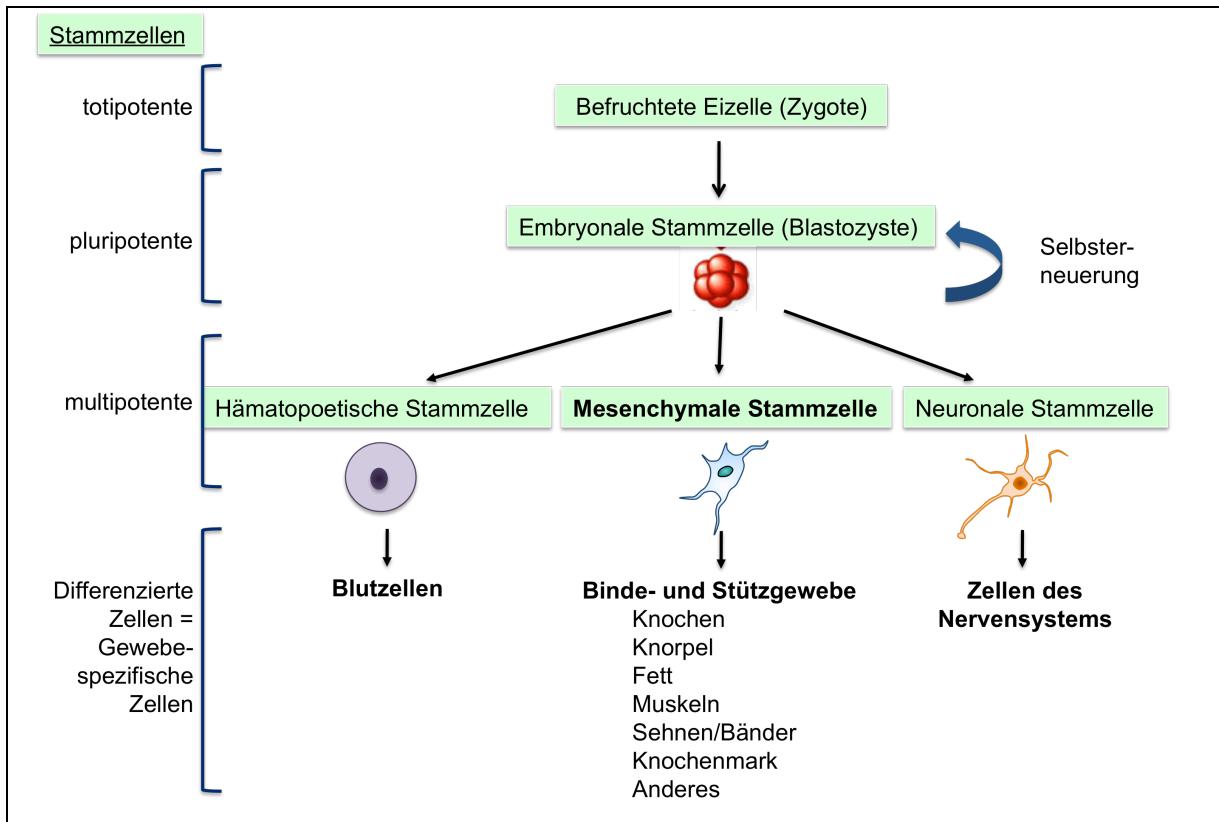


Abbildung 2: Stammzellbildung und -differenzierung (modifiziert nach www.bio-rad.com)

Embryonale Stammzellen (ESC) kommen in der Blastozyste vor und sind pluripotent, d.h. sie können jeden möglichen Zelltyp im Körper bilden. Sie können auch unbegrenzt kultiviert und subkultiviert werden. Diese Fähigkeiten gehen während ihrer Entwicklung verloren; adulte Stammzellen sind weniger plastisch und können nur begrenzt in Kultur gezüchtet werden.

ESC sind als Grundlage für TERM-Anwendungen theoretisch attraktiv (Jukes et al., 2010, Roobrouck et al., 2011). Sie besitzen jedoch erhebliche Nachteile. Die Gewinnung von ESC erfordert die Zerstörung von Embryonen. Dies wirft bis heute ungelöste ethische und moralische Fragen auf. Daneben sind ESC schwer zu kultivieren und es ist nicht auszuschließen, dass sie potentiell kanzerogen sind (Kuhn et al., 2010, Herberts et al., 2011). Die jüngste Entwicklung von induzierten, pluripotenten Stammzellen (iPS) verspricht, auf den Einsatz von ESC verzichten zu können (Illich et al., 2011, Wu et al., 2011, Harrison et al., 2014). Jedoch steht ihr klinischer Einsatz noch ganz am Anfang.

Vor diesem Hintergrund haben sich adulte Stammzellen, wie MSC, als interessante Kandidaten für die Reparatur und Regeneration von mesenchymalem Gewebe, wie zum Beispiel Knochen und Knorpel, entwickelt. Ein anderer, praktischer Vorteil der MSC besteht in der Einfachheit

ihrer Gewinnung. Sie können durch eine simple Knochenmarkaspiration am Beckenkamm, im Bereich der Crista iliaca posterior, entnommen und leicht durch Plastik-Adhärenz isoliert werden. Letzteres ist eines von mindestens drei Kriterien, die die *International Society for Cellular Therapy* zur Definition von MSC festgelegt hat (Dominici et al., 2006).

1.3 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Die recht einfache Handhabung ihrer Isolierung und Vermehrung sowie ihr Multilinien-Differenzierungspotenzial machen die multipotenten MSC zu vielversprechenden Kandidaten in der Klinik, um Struktur und Funktion von mesenchymalem Gewebe nach Verletzung oder Krankheit wiederherzustellen (Pittenger, 2008). Mehr als tausend PubMed-Publikationen zum Einsatz von MSC bei Gewebereparatur und -regeneration unterstreichen das außerordentliche medizinische Interesse an diesem Forschungsgebiet.

Arnold Caplan hat das Konzept der MSC entwickelt und prägte ihren Namen „mesenchymale Stammzelle“ (Caplan, 1991). Allerdings entdeckte und charakterisierte Friedenstein die Zellen in den 1970er Jahren als Erster und beschrieb sie als plastisch haftende Fibroblasten-ähnliche Zellen aus dem Knochenmark (Friedenstein et al., 1968, Friedenstein, 1976).

Wenngleich MSC ursprünglich aus Knochenmark isoliert wurden (Pittenger et al., 1999), enthalten auch verschiedene andere Gewebe und Organe MSC, u.a. Muskeln (Bosch et al., 2000), Haut (Young et al., 2001), Synovialmembran (De Bari et al., 2001), spongiöser Knochen (Noth et al., 2002). Eine attraktive Quelle stellt zudem Fettgewebe dar, in welchem reichlich MSC vorkommen, die relativ einfach durch Liposuktion gewonnen werden können (Zuk et al., 2001, Gimble et al., 2003). Eine ungelöste Frage in der Biologie der MSC ist, für welchen Einsatz welche Quelle die therapeutisch am besten Geeignete ist. Die Frage hierbei ist, ob MSC von verschiedenen Geweben äquivalent sind oder ob sie am wirkungsvollsten sind, wenn sie für das Gewebe zur Reparatur eingesetzt werden, aus dem sie ursprünglich stammen. Die Meinungen gehen in letztere Richtung, jedoch sind hier weitere Forschungsarbeiten notwendig (Bianco et al., 2013, Evans, 2013).

Die MSC stellen eine Gruppe adulter Vorläuferzellen dar, die in Kultur in hohem Maße proliferieren können. Unter angemessenen Kulturbedingungen können sie als adhärenter

Monolayer über mehrere Passagen kultiviert werden, ohne ihre Fähigkeit zur Multilinien-Differenzierung zu verlieren (Pittenger et al., 1999). Die Fähigkeit zur Multilinien-Differenzierung wird auch als *stemness* bezeichnet.

MSC können eine Vielfalt an verschiedenen, differenzierten Zell-Phänotypen bilden, wie zum Beispiel Muskel, Knochenmark und andere Gewebe mesenchymalen Ursprungs (Abbildung 3). Dies verschafft den Zellen die Möglichkeit, in einen großen Bereich von mesenchymalen Geweben an der Regeneration teilzunehmen.

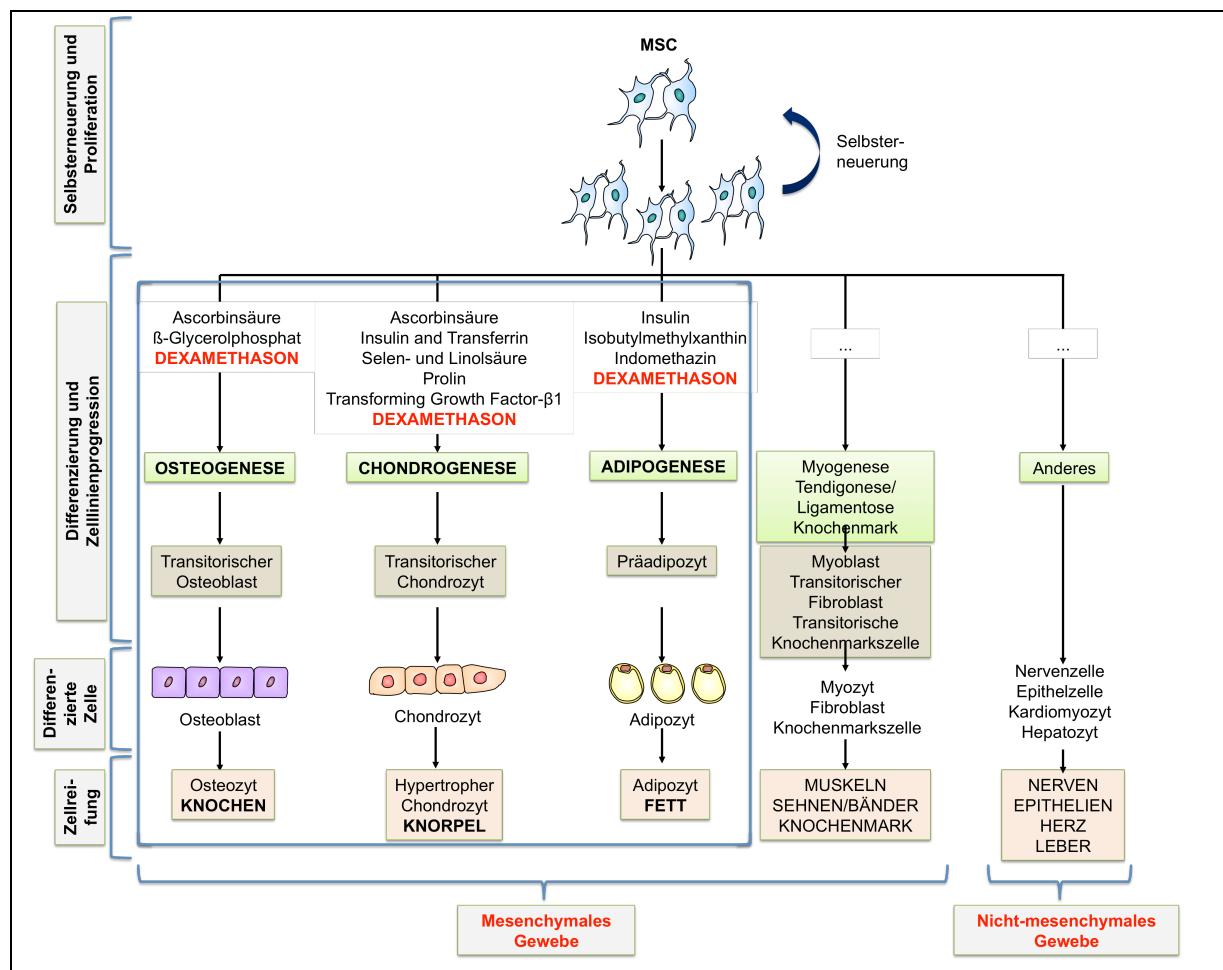


Abbildung 3: MSC Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung (modifiziert nach Caplan et al., 2001). Multilinien-Differenzierung der MSC zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten erfordert u.a. Dexamethason.

Viele Forschungsgruppen haben sich intensiv mit dem therapeutischen Nutzen von MSC mit dem Ziel befasst, Knochen (Bueno et al., 2009, Noth et al., 2010, Dimitriou et al., 2011, Steinert et al., 2012), Knorpel (Noth et al., 2008, Noth et al., 2010, Huey et al., 2012, Gardner et al., 2013, Wang et al., 2014), Sehnen sowie Bänder zu heilen (Hsu et al., 2010, Kuo et al., 2010, Lui et al., 2011). Es gibt viele Beispiele für ihren klinischen Einsatz; trotzdem fehlen bisher große,

randomisiert kontrollierte Studien (siehe <http://www.clinicaltrials.gov>, Register des *US National Institute of Health* (NIH) für klinische Studien, zuletzt besucht am 23.02.2015). Zum aktuellen Forschungsstand zum Einsatz von MSC in klinischen Studien existieren detaillierte Reviews (Giordano et al., 2007, Malgieri et al., 2010, Tolar et al., 2010, Trounson et al., 2011, Sharma et al., 2014). Bisher hat die *US Food and Drug Administration* (FDA) keine MSC-basierten Produkte zugelassen (<http://www.fda.gov>, zuletzt besucht am 16.03.2015).

Interessant ist, dass MSC auch zu Kardiomyozyten differenzieren können. Sie könnten deshalb reizvoll für den Einsatz bei kardialem Remodeling nach Herzinfarkt sein (Shake et al., 2002, Pittenger et al., 2004). Mehrere klinische Versuche am Patienten haben hierzu bereits stattgefunden (Sheridan, 2013).

Generell können MSC genetisch modifiziert werden, um ihr therapeutisches Potenzial möglicherweise zu erhöhen (Evans et al., 1995, Lieberman et al., 1999, Evans et al., 2009, Evans, 2011, Evans, 2012).

MSC wurden zudem für die Behandlung von *Osteogenesis Imperfecta* (OI) untersucht (Horwitz et al., 2002, Marino et al., 2008). Hierbei können die Zellen entweder als allogenes Transplantat von nicht an OI erkrankten Probanden genutzt werden. Oder körpereigene Zellen werden genetisch modifiziert, um den genetischen Defekt zu korrigieren und können dann als autologes Transplantat verwendet werden. Eine praktische Schwierigkeit bei diesem Verfahren liegt in der mangelhaften Anhaftungsfähigkeit von Spender-MSC bei der Implantationsoperation (Le Blanc et al., 2005). Wenn dieses *Engraftment*-Problem überwunden werden kann, können native oder genetisch modifizierte MSC in Betracht gezogen werden, um OI, Osteoporose und andere ähnliche Krankheitszustände zu behandeln.

In jüngerer Zeit haben MSC als mögliche Behandlungsmethode bei Osteoarrose (OA) viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen (Marino et al., 2008, Centeno et al., 2010). Eine Vielzahl an klinischen Studien ist in Durchführung, bei denen autologe MSC in OA-betroffene Gelenke gespritzt werden (<http://www.clinicaltrials.gov>, 22 Studien, davon 18 Studien mit autologen MSC aus Knochenmark, 4 Studien mit autologen MSC aus Fettgewebe, Stand 23.02.2015). Dieses Verfahren basiert auf der Annahme, dass die Zellen Faktoren sezernieren, die den Heilungsprozess positiv beeinflussen und Vorläuferzellen für die Geweberegeneration zur Verfügung stellen. ChondrogenTM ist beispielsweise ein MSC-basiertes Produkt, welches in OA-

betroffene Kniegelenke gespritzt wird; es wird aktuell einer Phase I/II-Studie unterzogen (Osiris Therapeutics).

So wie MSC als Quelle von Gewebevorläufern dienen, so werden ihnen auch immunsuppressive Eigenschaften zugeschrieben (Jorgensen et al., 2003, Ryan et al., 2007). Die Hämatologen Lazarus und Gerson prüften die Fähigkeit der MSC, als Unterstützerzellen während der Transplantation von blutbildenden Stammzellen (HSC) zu fungieren (Lazarus et al., 1995). Dies führte letztlich zu Versuchen von Le Blanc et al., eine intravenöse Infusion von *in vitro* expandierten MSC als Alternativtherapie bei pädiatrischen Patienten mit steroidresistenter, akuter Graft-versus-Host Erkrankung (GVHD) zu testen (Le Blanc et al., 2004, Le Blanc et al., 2008). Die klinische Anwendung von MSC zur Behandlung der pädiatrischen GVHD wurde in Kanada und Neuseeland jüngst zugelassen (Prochymal®; Osiris Therapeutics, 2012).

Obwohl dies nicht direkt TERM betrifft, demonstrieren diese Studien, dass MSC in Menschen sicher sind und, zumindest bei einer Indikation, effektiv wirken. Dieser Nachweis ist sehr hilfreich, um die Akzeptanz zu steigern, MSC in menschlichen Zelltherapien zu verwenden.

Eine zusätzliche wichtige Eigenschaft der MSC ist ihre Fähigkeit, nützliche Wachstumsfaktoren und Zytokine zu produzieren und auszuschütten. Mögliche Kandidaten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Neue Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Fähigkeit der MSC, die Mikroumgebung eines Gewebes via Sekretion von löslichen Faktoren zu ändern, eine signifikante Rolle im Heilen von Gewebe spielt (Gnecchi et al., 2008, Djouad et al., 2009, Hocking et al., 2010). In der Tat könnte es sein, dass diese sekretorische oder „trophische“ Funktion (Caplan et al., 2006) wichtiger ist als ihre Fähigkeit zur Differenzierung (Phinney et al., 2007). Diese löslichen Faktoren sind imstande, das Verhalten von benachbarten Zellen (parakrine Aktivität) sowie von der eigenen MSC (autokrine Aktivität) zu beeinflussen.

Wachstumsfaktor/Zytokin	Abkürzung	Referenz
Angiopoetin-1	AGPT-1	(Gnecchi et al., 2008, Siegel et al., 2013)
α 4-Laminin	α 4-Laminin	(Kuhn et al., 2010)
Bone morphogenetic Protein-2	BMP-2	(Gnecchi et al., 2008)
Bone morphogenetic Protein-6	BMP-6	(Gnecchi et al., 2008)

Basaler Fibroblasten-Wachstumsfaktor	bFGF	(Siegel et al., 2013)
Epidermaler Wachstumsfaktor	EGF	(Eom et al., 2014)
Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2	FGF-2	(Zaragozi et al., 2006, Gnechi et al., 2008, Eom et al., 2014)
Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4	FGF-4	(Eom et al., 2014)
Fibroblasten-Wachstumsfaktor-7	FGF-7	(Gnechi et al., 2008)
FMS-like Tyrosinkinase-3-Ligand	Flt3l	(Majumdar et al., 1998, Reese et al., 1999, Cheng et al., 2003)
Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor	G-CSF	(Haynesworth et al., 1996)
Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor	GM-CSF	(Guzmán-Morales et al., 2009)
Hepatozyten-Wachstumsfaktor	HGF	(Gnechi et al., 2008, Park et al., 2010, Siegel et al., 2013, Eom et al., 2014)
Insulinähnlicher-Wachstumsfaktor-1	IGF-1	(Gnechi et al., 2008)
Interleukin-1	IL-1	(Gnechi et al., 2008, Guzmán-Morales et al., 2009)
Interleukin-3	IL-3	(Reese et al., 1999)
Interleukin-4	IL-4	(Guzmán-Morales et al., 2009)
Interleukin-6	IL-6	(Haynesworth et al., 1996, Majumdar et al., 1998, Kim et al., 1999, Reese et al., 1999, Cheng et al., 2003, Gnechi et al., 2008, Guzmán-Morales et al., 2009, Pricola et al., 2009, Kuhn et al., 2010, Park et al., 2010)
Interleukin-7	IL-7	(Majumdar et al., 1998)
Interleukin-8	IL-8	(Majumdar et al., 1998, Park et al., 2010)
Interleukin-10	IL-10	(Guzmán-Morales et al., 2009)
Interleukin-11	IL-11	(Haynesworth et al., 1996, Majumdar et al., 1998, Kim et al., 1999, Cheng et al., 2003, Gnechi et al., 2008)
Interleukin-12	IL-12	(Majumdar et al., 1998)

Interleukin-14	IL-14	(Majumdar et al., 1998)
Interleukin-15	IL-15	(Majumdar et al., 1998)
Leukämie-Hemmfaktor	LIF	(Haynesworth et al., 1996, Reese et al., 1999, Cheng et al., 2003, Gnechi et al., 2008, Siegel et al., 2013)
Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor	M-CSF	(Haynesworth et al., 1996, Majumdar et al., 1998, Gnechi et al. 2008)
Makrophagen-Hemmfaktor	MIF	(Gnechi et al., 2008)
Nervaler Wachstumsfaktor	NGF	(Siegel et al., 2013)
Stammzellfaktor	SCF	(Haynesworth et al., 1996, Majumdar et al., 1998, Reese et al., 1999, Cheng et al., 2003, Gnechi et al., 2008)
Transforming Growth Factor- β	TGF- β	(Gnechi et al., 2008, Park et al., 2010)
Tumornekrosefaktor- α	TNF- α	(Gnechi et al., 2008, Guzmán-Morales et al., 2009)
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF	(Gnechi et al., 2008, Guzmán-Morales et al., 2009, Park et al., 2010, Siegel et al., 2013)

Tabelle 1: Wachstumsfaktoren und Zytokine, die von hMSC potentiell ausgeschüttet werden

Dementsprechend lautet die Hypothese der vorliegenden Untersuchung, dass diese Faktoren daran beteiligt sind, die *stemness* der Stammzellen während ihrer Vermehrung in *in vitro*-Zellkultur aufrechtzuerhalten. Mein Projekt fokussiert hierbei auf die autokrinen sowie parakrinen Reaktionen. Dies ist sehr wichtig für das Tissue Engineering, weil die MSC vor ihrer klinischen Verwendung *in vitro* vielfach vermehrt werden müssen, ohne dabei ihren Phänotyp zu verlieren. Wie später erläutert, existiert bisher genau zu diesem Thema erstaunlich wenig Literatur.

Die vorliegende Studie prüft die drei am häufigsten untersuchten, mesenchymalen Zelllinien: Die Differenzierung zu Knochenzellen (Caplan, 1991, Haynesworth et al., 1992), Knorpelzellen (Johnstone et al., 1998, Mackay et al., 1998, Yoo et al., 1998) und Fettzellen (Pittenger et al., 1999). Das Potenzial der Dreilinien-Differenzierung zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten stellt außerdem das zweite von den mindestens drei Kriterien für die Definition von MSC durch die *International Society for Cellular Therapy* dar (Dominici et al., 2006).

1.4 Die Rolle Dexamethasons bei der MSC-Differenzierung und dessen Relation zur *stemness*

Wie bereits oben dargelegt, ist das Multilinien-Differenzierungspotenzial ein Charakteristikum der MSC. Dies wurde bereits sehr intensiv unter *in vitro* - Bedingungen untersucht. Dabei wurden auch die entsprechenden Stimuli definiert, die für die Differenzierung zu ganz spezifischen Zelllinien *in vitro* erforderlich sind.

Das Hinzufügen von Dexamethason ist nötig, um die MSC *in vitro* dahingehend zu stimulieren, einen jeweils mehr osteogenen, chondrogenen oder adipogenen Phänotyp anzunehmen (Pittenger et al., 1999). Das synthetische Glukokortikoid besitzt sehr starke anti-inflammatoryische und immunsuppressive Eigenschaften. Bisher ist völlig ungeklärt, warum Dexamethason zur Einleitung der Differenzierung der MSC erforderlich ist. Es ist sonderbar, dass für dieses Phänomen experimentelle Beobachtungen fehlen.

Im Fall der Osteogenese scheinen allein physiologische Konzentrationen an Dexamethason auszureichen, um die Schlüsselemente des osteoblastischen Phänotyps *in vitro* zu induzieren (Kim et al., 1999, Guzmán-Morales et al., 2009) und die osteogene Differenzierung zu fördern (Miller et al., 2011). Dies gilt, obwohl hoch dosiertes oder längerfristig gegebenes Dexamethason Knochenverlust fördern und das Osteoporoserisiko steigern kann, wie man es beim Cushing-Syndrom beobachtet (Cheng et al., 1996). Dexamethasonsupplementierung ist in Forschungslaboren eine etablierte Methode, um die Differenzierung von MSC in Osteoblasten *in vitro* zu induzieren.

Um die Differenzierung zu Chondrozyten einzuleiten, müssen MSC in eine runde Morphologie überführt werden und sich verdichten. In der Praxis geschieht dies durch Zentrifugieren der MSC zu einem Pellet. Hierbei ist zudem die Ergänzung eines Wachstumsfaktors wie Transforming Growth Factor- β (TGF- β) als Zusatz zu Dexamethason nötig (Johnstone et al., 1998).

Für die Adipogenese ist es neben Dexamethason unerlässlich, Isobutylmethylxanthin, Indomethazin und Insulin hinzuzufügen (Pittenger et al., 1999).

Alle drei Zelllinien sind unterschiedlich und benötigen verschiedene Differenzierungsstimuli (Abbildung 3). Es ist erstaunlich, dass in allen Fällen Dexamethason hinzugefügt werden muss, um die MSC-Differenzierung zu stimulieren.

1.5 Fragestellung

Eine große Herausforderung bei der klinischen Verwendung von MSC im Bereich des TERM ist ihre kontrollierte Differenzierung zu ihren spezifischen Phänotypen.

Dabei ist auch der Frage nachzugehen, ob und wie die MSC ihre Fähigkeit zur Multilinien-Differenzierung während der multiplen Zellteilungen aufrechterhalten. Letzteres ist die notwendige Voraussetzung, um eine ausreichende Anzahl an Zellen für den klinischen Einsatz zu gewinnen.

Wie bereits erwähnt, behaupten einige Studien aus der Literatur, dass lösliche Faktoren, welche von den MSC gebildet und ausgeschüttet werden, die Zellen in ihrem undifferenzierten Status bewahren. Eine Möglichkeit, die Eigenschaften dieser Faktoren zu untersuchen, stellt die Bestimmung ihrer Aktivität in CM dar.

Konkret befasst sich die vorliegende Studie mit der Frage, welchen Effekt CM auf das Zellüberleben und auf Dexamethason-induzierte Osteogenese, Chondrogenese und Adipogenese der hBMSC in *in vitro* - Langzeitkultur hat.

Das Ziel hierbei ist, die Hypothese zu testen, dass MSC einen/mehrere lösliche Faktoren produzieren, die die Differenzierung zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten hemmen (Abbildung 4) und dadurch die *stemness* während der multiplen, für das Tissue Engineering nötigen Zellpassagen bewahren.

Das vorliegende Projekt beschäftigt sich auch mit der Frage, warum in allen Fällen Dexamethason verwendet werden muss, um die MSC-Differenzierung zu induzieren.

Eine Stärke der Hypothese ist, dass sie eine mögliche Erklärung für den Effekt von Dexamethason liefert – nämlich, dass Dexamethason die Synthese dieser möglichen *stemness*-Faktoren hemmt (Abbildung 4).

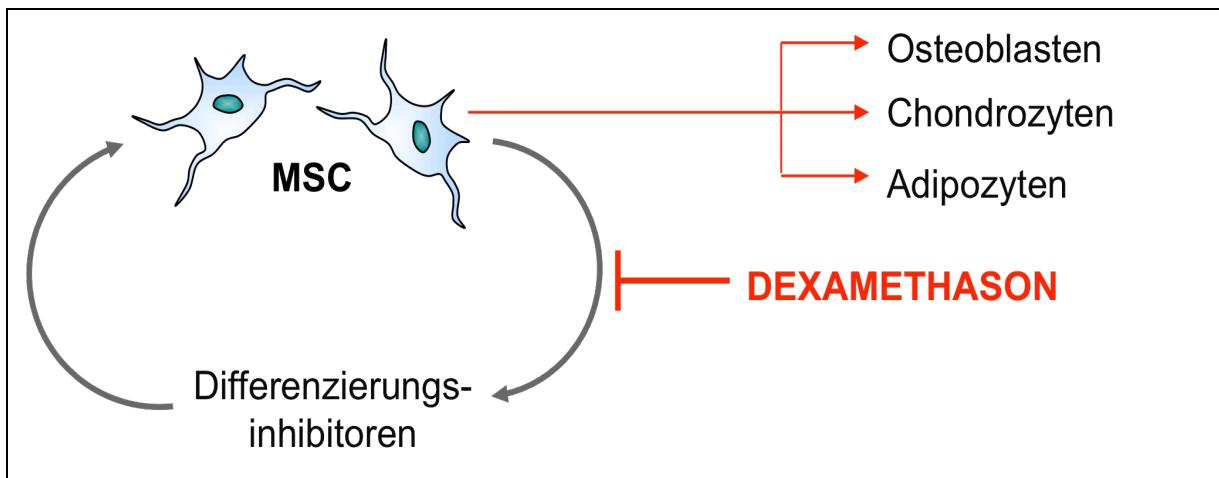


Abbildung 4: Hypothese der hier vorliegenden Studie: MSC produzieren und schütten lösliche Faktoren aus, die die Zellen in ihrem unendifferenzierten Status bewahren. Subhypothese: Dexamethason hemmt diese Differenzierungsinhibitoren und ermöglicht dadurch die Differenzierung der MSC.

2 Methoden

Alle Experimente wurden im Labor von Prof. Christopher H. Evans im „Center for Advanced Orthopaedic Studies“ am Beth Israel Deaconess Medical Center der Harvard Medical School in Boston, USA durchgeführt. Meine Betreuerin in Boston war Elisabeth Ferreira PhD.

Für die Experimente wurden als Erstes hBMSC in verschiedenen Konzentrationen in Kultur gesät und kultiviert. Auf diese Weise wurde *in vitro* das erwünschte CM, in dem sich die potentiellen autokrinen und parakrinen Faktoren befinden, gewonnen.

Parallel hierzu wurden neue Kulturen mit hBMSC durch einen sich wiederholenden Kreislauf aus Saat, Proliferation, Trypsinierung und Wiederaussaat in einer ausreichenden Menge für die Experimente gewonnen.

Diesen neuen Kulturen wurde dann das gewonnene CM der verschiedenen Zellsaattichten hinzugefügt.

Schließlich wurden diese Empfängerzellen auf ihre Fähigkeit zur Differenzierung zu Osteoblasten, Chondrozyten oder Adipozyten hin untersucht.

2.1 Zellbiologische Methoden

Für alle Experimente wurden humane MSC (hMSC) verwendet. Alle Arbeiten mit vitalen Zellen wurden stets an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die angewandten zellbiologischen Techniken umfassen die Isolierung und Kultivierung von Zellen, die Zellpassage, die Bestimmung der Zellzahl und das Einfrieren sowie das Auftauen von Kulturzellen. Grundlegender Bestandteil der Arbeit war die Konzentrierung konditionierten Zellmediums und die Dreilinien-Differenzierung der MSC zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten.

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Medien und Lösungen vor Gebrauch im Wasserbad bei 37°C zeitnah zum Experiment erwärmt.

2.1.1 MSC Isolierung aus humanem Knochenmark (hBMSC)

Hauptbezugsquelle der hMSC ist das menschliche Knochenmark. Die Zellen werden dann als *human bone marrow-derived mesenchymal stem cells* bezeichnet (hBMSC). In der vorliegenden Arbeit wurde es drei anonymisierten Patienten (Tabelle 2) während einer Hemiendoprothesenoperation der Hüfte (HEP) im Massachusetts General Hospital oder Brigham and Women's Hospital (Boston, MA, USA) mit der Erlaubnis des lokalen *Institutional Review Boards* (IRB) entnommen. HBMSC von mindestens 2 dieser Patienten wurden für jeden Versuch verwendet.

Alter (Jahre)	Geschlecht	Indikation der HEP
81	männlich	Dislozierte Hüfte
51	weiblich	Posttraumatische Arthritis bei Z.n. Azetabulumfraktur
37	männlich	Posttraumatische Arthritis bei Z.n. Azetabulumfraktur

Tabelle 2: Patienteninformation

HBMSC-Kulturen wurden mithilfe der von Porter et al. beschriebenen Methoden (Porter et al., 2009) etabliert. Knochenmarksmaterial wurde aseptisch mit einem *Reamer-Irrigator-Aspirator* (RIA) gewonnen. Die Knochenpartikel wurden mit einem *In-line Biomed Redi-Flow® open pore-* Filter entfernt. Der Durchfluss mit den zellkernhaltigen Markzellen wurde in einem sterilen Behälter aufgefangen. Daraufhin wurden die Zellen mittels einer 30-minütigen Dichtegradientenzentrifugation bei 400 G und 4°C isoliert.

Anschließend wurden die mononuklearen Zellen in Zellkulturflaschen (175 cm^2) mit einer Konzentration von $1,8 \times 10^5$ zellkernhaltigen Zellen/ cm^2 in Standardmedium kultiviert, welches DMEM-*low glucose* (DMEM-LG mit 1 mM Pyruvat, Mediatech), 10% fetales Rinderserum (FBS, Thermo Scientific) und 1% Antibiotika-Antimykotika (AbAm, Invitrogen) enthielt.

Nach Primärkultur wurde ein Teil der Zellen zur Lagerung eingefroren. Ein anderer Teil wurde expandiert, bis für alle vorgesehenen Experimente eine ausreichende Anzahl von Zellen und eine ausreichende Menge von konditioniertem Medium (CM) vorhanden war. CM beschreibt ein Medium, in welchem die Zellen für eine Zeitperiode kultiviert werden und in welches sie verschiedene Substanzen, wie Metabolite, Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixproteine ausschütteten.

Die Plastizität der Stammzellen und ihr Multilinien-Differenzierungspotenzial in Richtung verschiedener mesenchymaler Zelllinien wurden im Vorfeld im Labor getestet (Porter et al.,

2009, Wehling et al., 2009); auch wurden sie als CD 44+, CD 90+, CD 105+ und CD 45- identifiziert (Porter et al., 2009).

2.1.2 Zellkultur

Alle Zellen wurden *in vitro* in Zellkulturflaschen (175 cm^2 Adhärenzfläche) in einem Inkubator in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂-Begasung gehalten und gezüchtet. Die Zellen wurden in Standardmedium, welches DMEM-LG, 10% FBS und 1% AbAm enthielt, kultiviert.

Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die in der Primärkultur liegenden hBMSC subkultiviert, um schädliche Effekte einer anhaltend hohen Zelldichte zu vermeiden. Hierzu wurden die adhärenten Zellen mit einer Mischung aus 0,05% Trypsin (Invitrogen) und 1 mM EDTA (Invitrogen) von der Oberfläche gelöst.

Dafür wurden die Zellen vorerst mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, Mediatech) gewaschen, um jegliche Spuren von Serumproteinen zu entfernen, die die Aktionen von Trypsin inhibieren. Anschließend folgte eine ca. 5-minütige Inkubation mit Trypsin-EDTA. Nach erfolgreicher Lösung der Zellen vom Plastik, welche durch häufiges Mikroskopieren überwacht wurde, wurde frisches Standardmedium hinzugefügt; die im FBS enthaltenen Proteinaseinhibitoren sind dabei dafür verantwortlich, die Reaktion zu stoppen und auf diese Weise Schäden an den Zellen zu verhindern.

Nach Bestimmung der Zellzahl, wie unter 2.1.4 beschrieben, wurden die Tochterzellen mit einer Konzentration von 5.000 Zellen/ cm^2 in 175 cm^2 Zellkulturflaschen in 25 ml Standardmedium überführt.

Dieser Kreis aus Zellsaat, Proliferation, Passage bei ca. 80%-iger Konfluenz und Aussaat der Tochterkultur erlaubte die Vermehrung der Stammzellen. Diese Schritte wurden wiederholt, bis eine ausreichende Menge an hBMSC für die geplanten Versuche vorhanden war. Bis zu maximal 7 Passagen durften die Zellen hierbei durchlaufen.

Weil die Retention der *stemness* durch die Zellsaatdichte beeinflusst wird (Colter et al., 2000, Sekiya et al., 2002), wurden die hBMSC-Spenderkulturen für die Gewinnung von CM in unterschiedlichen Dichten von 1.000, 5.000 und 10.000 Zellen/ cm^2 in 175 cm^2 Zellkulturflaschen in Standardmedium gesät. Dieses Vorgehen ergab Zellkulturen, deren Zellen sich in verschiedenen Raten teilten und die verschiedene Zell-zu-Zell-Kontaktgrade aufwiesen. So war es möglich, den Einfluss der Zellteilung und des Zell-zu-Zell-Kontaktes auf die

Produktion von möglichen Faktoren zu untersuchen.

Alle 3 Tage wurde das konditionierte Medium von diesen unterschiedlich angesäten Kulturen gesammelt. Zugleich wurden die Zellen trypsiniert, gezählt und in ihrer Originaldichte erneut ausgesät. Hierbei wurden Zellen mit einer Zellsaatzdichte von 5.000 und 10.000 Zellen/cm² bei einer ca. 80%igen Konfluenz, dagegen Zellen mit einer Zellsaatzdichte von 1.000 Zellen/cm² bei einer Konfluenz von 50% trypsiniert. Dadurch blieb das Maß der Zellteilung und des Zellkontakte weitgehend konstant.

Eine zusätzliche Kontrollgruppe enthielt Zellen, die mit einer Dichte von 1.000 Zellen/cm² beimpft waren und die bis zu einer 90%igen Konfluenz ohne Zellpassage expandieren durften („upc“ in folgenden Abbildungen). Das Medium wurde auch hier alle 3 Tage gesammelt.

Diese Schritte wurden wiederholt, bis ausreichend CM für die geplanten Versuche gewonnen war. Dies dauerte im Durchschnitt 30 Tage.

2.1.3 Konzentrierung und partielle Reinigung des konditionierten Mediums

Zur Konzentrierung und partiellen Reinigung der im CM sezernierten Faktoren wurden zentrifugale Filter (Centricon® Plus-70, Millipore) gemäß den Vorschriften des Herstellers verwendet (Abbildung 5).

Die Columns hatten einen Cutoff bei einem Molekulargewicht (MW) von 10.000 Dalton. Dies erlaubte die Gewinnung von Proteinen und anderen Molekülen, die größer als 10.000 Dalton sind. Kleinere Moleküle wurden entfernt.

Ein Filter reinigte und konzentrierte 70 ml gesammeltes CM auf eine Restsuspension von 450 µl herunter. Dieses Konzentrat wurde für die Untersuchung der Osteo- und Adipogenese wiederum in 45 ml DMEM-LG, 10% FBS und 1% AbAm gelöst. Zur Untersuchung der Chondrogenese wurde das Konzentrat in 45 ml DMEM-high glucose (4,5 g/l) (DMEM-HG, Mediatech), 1% ITS + Premix (BD Biosciences) und 1% AbAm resuspendiert.

Letztendlich resultierte 70 ml CM in der Rückgewinnung von 45 ml frischem Medium, das Komponenten vom originalen CM enthielt; ohne Moleküle, die kleiner als 10 KDa groß waren und ca. 1,6-fach konzentriert. Dieses Medium wird konzentriertes CM (cCM) genannt.

Um Variationen zwischen verschiedenen Chargen zu vermeiden, wurde jedes Mal ausreichend cCM für die Ausführung einer kompletten Serie an Experimenten produziert.

Um einen potentiell dosisabhängigen Effekt festzustellen, wurden verschiedene Verdünnungen des cCM untersucht:

- keine Verdünnung = 100% konditioniertes Medium (+ 0% Standardmedium)

- 1,5-fache Verdünnung = 66,6% konditioniertes Medium (+33,3% Standardmedium)
- 2-fache Verdünnung = 50% konditioniertes Medium (+ 50% Standardmedium)
- 4-fache Verdünnung = 25% konditioniertes Medium (+ 75% Standardmedium)
- 10-fache Verdünnung = 10% konditioniertes Medium (+90% Standardmedium)

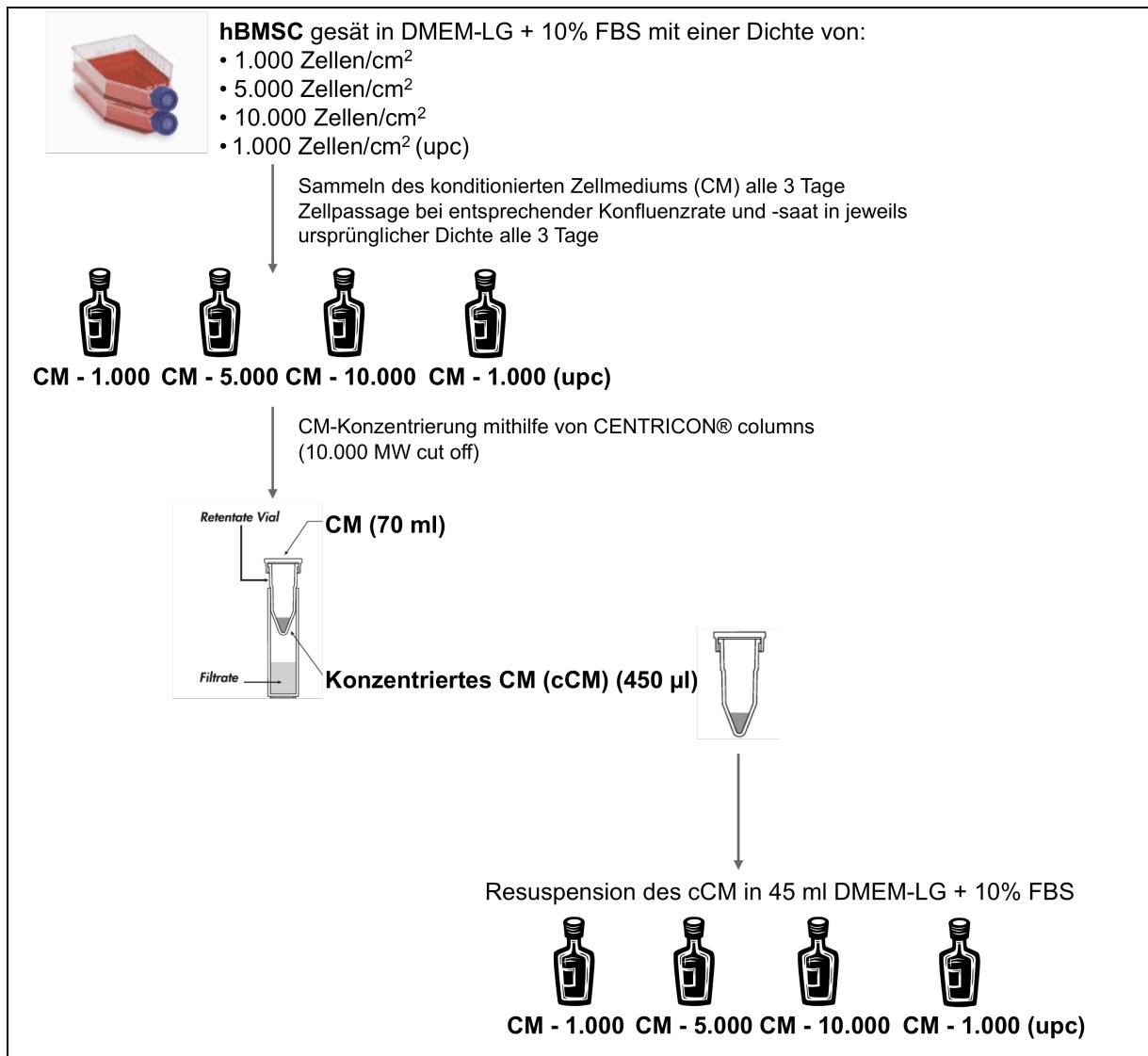


Abbildung 5: Methode zur Produktion eines konzentrierten, konditionierten Mediums (cCM). (upc) bedeutet, die Zellen durften bis zu einer Konfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt (HC, Reichert). Für ein akkurate Ergebnis wurden jeweils 10 µl Proben an trypsinierter Zellsuspension in 2 Hämatozytometer transferiert und die Zellen in allen 9 Großquadranten unter einem 10X Objektiv im Mikroskop gezählt (HC#1 und HC#2).

Die Zellzahl pro ml Lösung kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{(\text{Zellen HC } \#1 + \text{Zellen HC } \#2)}{9 \times 2} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.1.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Nach Isolierung und Proliferation der hBMSC wurden überschüssige Zellen zur weiteren Verwendung eingefroren.

Hierzu wurden die Zellen bei einer ca. 80%-igen Konfluenz von den Zellkulturplatten mit Trypsin-EDTA (Life Technologies) abgelöst und die Zellzahl bestimmt.

Die Zellsuspension wurde bei 400 G und Raumtemperatur für 5 Minuten zu Pelletzellen zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in einem 4°C kalten Gefriermedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; RecoveryTM Cell Culture Freezing Medium, Life Technologies) resuspendiert und in 1 ml Aliquots in Kryogefäßen für eine Stunde im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Die Zellen wurden sequentiell eingefroren, erst bei -20°C für eine Stunde, anschließend bei -80°C für eine Stunde und letztlich in flüssigem Stickstoff bei -180°C für Langzeitlagerung.

Vor Beginn eines neuen Versuchs wurden die kryokonservierten Zellen aus dem Stickstofftank unmittelbar zum Auftauen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Nach Verflüssigung des Mediums erfolgte umgehend eine Verdünnung mit Standardmedium. Daraufhin wurden die Zellen bei 400 G und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, in eine Zellkulturflasche (75 cm^2 Adhärenzfläche) transferiert und kultiviert.

Ein Tag später war es notwendig, das Medium zu wechseln, um die Konzentration des im Gefriermedium enthaltenen DMSO zu reduzieren, sowie die toten oder nicht-adhärenen Zellen, die unerwünschte Faktoren produzieren könnten, zu eliminieren.

2.1.6 Zelldifferenzierung

2.1.6.1 Osteogene Linie

Osteogene Differenzierung erfolgte nach allgemein anerkanntem Verfahren (Jaiswal et al., 1997).

Passage 4 und 6 hBMSC wurden mit einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in dreifacher Ausführung in 24-well Zellkulturplatten in 0,4 ml/well DMEM-LG, 10% FBS und 1% AbAm gesät. 24 Stunden später wurde den Zellen das cCM von Kulturen, die, wie vorher beschrieben wurde, in unterschiedlichen Dichten gesät wurden, hinzugefügt.

Dem Medium wurde 50 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma) in An- oder Abwesenheit von 10⁻⁷ M Dexamethason (Sigma-Aldrich) als osteogener Induktor supplementiert. Am 9. Tag nach cCM-Exposition wurde 10 mM β-Glycerolphosphat (Sigma-Aldrich) als Phosphatquelle zur Mineralablagerung dem Medium hinzugefügt.

Zwei Kulturgruppen wurden etabliert. Das Medium der Kontrollgruppe beinhaltete frisches Standardmedium oder cCM mit 50 µg/ml Ascorbinsäure und 10 mM β-Glycerolphosphat. Das Medium der anderen Gruppe wurde mit 10⁻⁷ M Dexamethason supplementiert.

Die Medien wurden alle 3 Tage für 3 Wochen gewechselt.

Der osteoblastische Phänotyp wurde, wie später im Detail beschrieben, mittels Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase (AP) am 10. Tag und der Kalziumablagerung der mineralisierenden Zellen am 21. Tag bestimmt. Außerdem wurde die Kalziumdeposition durch Alizarinrot-Färbung am 21. Tag histologisch beurteilt.

Zellüberleben und -proliferation wurden durch Messung des DNA-Gehaltes der Zellmonolayer am 10. und 21. Tag nach cCM-Addition evaluiert.

Der Effekt des cCM von Kulturen mit der höchsten Zellsaatdichte (10.000 Zellen/cm²) auf die Expression von Knochenmarkergenen wurde anhand einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bewertet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen vorerst in einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in dreifacher Ausführung auf 6-well Zellkulturplatten in 0,8 ml/well Standardmedium gesät, cCM hinzugefügt und Osteogenese induziert. Die Isolierung der RNA für die Reverse Transkription und qPCR wurde an Tag 10 und 21 nach cCM-Exposition durchgeführt.

2.1.6.2 Chondrogene Linie

Die Chondrogenese der hBMSC erfolgte gemäß Standardmethoden unter Gebrauch von Pellet-Kulturen (Yoo et al., 1998, Penick et al., 2005).

HBMSC wurden mittels Trypsinierung und Zentrifugieren für 10 Minuten bei 400 G und 4°C gewonnen. Die Zellen wurden in einer Lösung mit serumfreien DMEM-*high glucose* (DMEM-HG mit 1 mM Pyruvat, Mediatech) und 1% AbAm gemischt, um eine finale Zellkonzentration von 1x10⁶ Zellen/ml zu erreichen. Diese Zellsuspension wurde möglichst homogen in 200 µl

große Aliquots jeweils in eine Kavität der 96-Mikrotiterplatten (Corning) mit einer Konzentration von 200.000 Zellen/well verteilt.

Im Unterschied zu den für Zellkultur verwendeten Polystyrenplatten bestanden die Platten für Pelletkultur aus Polypropylen, damit die Zellen am Plastik nicht haften blieben. Dies half, die Integrität der Pellets aufrechtzuerhalten.

Die Platten wurden bei 400 G und 4°C 8 Minuten lang zentrifugiert. Dies gewährleistete die Bildung eines Zellpellets am Boden der Kavität, welche für nachfolgende Chondrogenese notwendig war.

Der Überstand wurde vorsichtig aspiriert und mit 0,2 ml/well serumfreien DMEM-HG, 1% AbAm und 1% ITS+Premix (BD Biosciences) ersetzt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

24 Stunden später wurde das Medium durch ein chondrogenes Wachstumsmedium mit oder ohne cCM ersetzt. Dieses bestand aus DMEM-HG, 1% AbAm, 1% ITS+Premix, 40 µg/ml Prolin (Sigma-Aldrich) und 50 µg/ml Ascorbinsäure-2-Phosphat (Sigma). Je nach Studiengruppe wurden zusätzlich 10⁻⁷ M Dexamethason und/oder 10 ng/ml rekombinantes humanes Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1; Pepro Tech) (Johnstone et al., 1998) supplementiert. TGF-β1 fungierte hier als Wachstums- und Differenzierungsfaktor und verbesserte die Chondrogenese der hBMSC in diesem Setting (Hanada et al., 2001).

Die Pellets bildeten frei schwimmende Zellaggregate innerhalb der ersten 24 Stunden. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage für 4 Wochen gewechselt. Die Zellaggregate wurden am 28. Tag geerntet und für knorpelspezifische Tests herangezogen.

2.1.6.3 *Adipogene Linie*

Für die Dexamethason-induzierte Adipogenese wurden hBMSC mit einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² in dreifacher Ausführung in 24-well Zellkulturplatten in 0,4 ml/well DMEM-LG, 10% FBS und 1% AbAm gesät. 24 Stunden später folgte der Zusatz von cCM zu den Zellen und adipogenes Wachstumsmedium wurde hinzugefügt, welches 5 µg/ml Insulin (Sigma), 0,5 mM IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin, Sigma-Aldrich), 60 µM Indomethazin (Sigma) und 10⁻⁷ M Dexamethason (Sigma-Aldrich) enthielt (Pittenger et al., 1999). Letzteres fehlte in den Kontrollkulturen.

Das Medium wurde alle 3 Tage für 3 Wochen gewechselt. Die adipogene Differenzierung wurde histologisch mittels Oil Red O-Färbung, welche Lipidvakuolen aufdeckt, an Tag 21 nach cCM-Exposition beurteilt.

2.2 Analysemethoden

Folgende Methoden zur Untersuchung der Proliferation und Differenzierung der hBMSC wurden angewandt.

2.2.1 Messung des DNA-Gehaltes der hBMSC-Monolayerkulturen

Zellviabilität und -proliferation wurden durch Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellmonolayerkulturen an Tag 10 und 21 nach cCM-Zugabe evaluiert.

In einem ersten Schritt wurden die Zellen durch 400 µl Trypsin/well trypsiniert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde diesen 400 µl/well 2X TNE Puffer hinzugefügt. Es folgten 3 Zyklen, bei denen die Zellen im Wechsel jeweils für 18 Minuten bei -80°C eingefroren und bei 37°C aufgetaut wurden. Dadurch wurde die DNA freigesetzt.

Zur Quantifizierung des Gehalts an doppelsträngiger DNA (dsDNA) wurde das *Quant-iTTM PicoGreen[®] dsDNA Assay Kit* (Invitrogen) verwendet. Das Kit enthält ein ultra-sensitives, fluoreszentes Anfärbereagens, welches an dsDNA bindet und diese dadurch detektiert.

Die Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zusammenfassend wurde 100 µl Zelllyseseuspension jeder Versuchsreihe jeweils in zweifacher Ausführung in wells einer schwarzen, lichtundurchlässigen 96-well Zellkulturplatte transferiert. 100 µl/well 1X TE Puffer, der das fluoreszente Anfärbereagens enthält, wurde den Zellen hinzugefügt. Die Zellkulturplatten wurden vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.

Die Fluoreszenz als Maß für den DNA-Gehalt wurde schließlich mittels eines Mikroplattenlesegerätes (SynergyMx, BioTek Instruments) bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm gemessen. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mithilfe einer Standardkurve berechnet.

Im Falle der chondrogenen Zellpellets wurden Proben für das *Dimethylmethylenblau (DMMB) Dye Binding Assay* (Farndale et al., 1986), welches unter 2.2.3. beschrieben wird, vorbereitet. Die Pellets wurden 5 Mal verdünnt und dann wurde 5 µl der Probe mit 20 µl 1X TE Puffer vermischt. Für das *Quant-iTTM PicoGreen[®] dsDNA Assay* wurde 100 µl 1X TE Puffer/Picogreen[®] Anfärbereagens zu den 25 µl Proben hinzugefügt. Die Fluoreszenz wurde bei

einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm gemessen.

2.2.2 Analyse der Osteogenese

2.2.2.1 Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität

Die Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität ist ein etablierter, früher Marker der Osteogenese. Die alkalische Phosphatase (AP) dient dazu, Phosphat von passenden Substraten zur Bildung von Hydroxylapatit zu lösen.

Unter den experimentellen Bedingungen einer Zellkultur hydrolysiert die AP das Phosphat vom β-Glycerolphosphat. Das nun freie Phosphation präzipitiert mit Kalzium, um eine mineralisierte Matrix zu bilden, das Kalziumhydroxylapatit.

In der vorliegenden Arbeit wurde die AP-Aktivität nach Standardmethoden gemessen (Porter et al., 2009). Die Zellen wurden zweimal mit 1X PBS gewaschen. 250 µl/well synthetisches Phosphatasesubstrat, d.h. p-Nitrophenolphosphat (PNPP, Sigma-Aldrich), wurde den Zellen hinzugefügt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt, indem die Proben in Eppendorfröhrchen überführt wurden, die 250 µl 1 M Natriumhydroxid (NaOH) enthielten. Die Hydrolyse von PNPP und somit die Freisetzung von p-Nitrophenol (PNP, Sigma-Aldrich) wurde als Wechsel in der optischen Dichte bei 410 nm durch Verwendung eines Mikroplattenlesegerätes (SynergyMx, BioTek Instruments) erfasst. Die resultierende AP-Aktivität wurde zum DNA-Gehalt jeder Probe normalisiert und als nmol pnp/min/ng DNA ausgedrückt.

2.2.2.2 Bestimmung der Kalziumablagerung

Ausgefälltes Kalzium ist ein Indikator für den Mineralisierungsgrad von differenzierten Zellen und fungiert als später Marker der Osteogenese. In der vorliegenden Arbeit wurde zum Monitoring der Kalziumablagerung das *QuantiChrom™ Calcium Assay Kit* (BioAssay Systems) verwendet.

Durch vorsichtiges Aspirieren des Mediums, zweifaches Waschen der Zellen mit 1X PBS (Mediatech) und anschließendes Hinzufügen von 0,4 ml/well 4% Paraformaldehyd (pH 7,4; Sigma-Aldrich) für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellkulturen fixiert. Nach Entfernung des Paraformaldehyds wurden die Zellen zweimal mit kaltem, entionisiertem Wasser

gewaschen. Das Paraformaldehyd zu entfernen war wichtig, um dessen Reaktion mit Hydrogenchlorid (HCl) im Kalziumassay zu verhindern.

Nach 20-minütigem Trocknen an der Luft wurde den Zellen 0,5 ml/well 0,6 N HCl hinzugefügt, um das gefallte Kalzium zu lösen. Über Nacht wurden die Platten auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Lösung des Kalziums zu gewährleisten.

Am folgenden Tag wurden die Kalziumkonzentrationen gemäß Herstellerempfehlungen gemessen. Ohne jegliche Vorbehandlung wurden 5 µl verdünnte Kalziumchloridstandards und -proben in zweifacher Ausführung in die Kavitäten einer durchsichtigen 96-well Platte transferiert. 0,2 ml Arbeitsreagens wurde jeder Kavität hinzugefügt und die Platte wurde dann für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kalzium der Proben erzeugte bei der Reaktion mit Phenolsulphonphthalein (Bestandteil des Kit) ein farbiges Reaktionsprodukt. Die Konzentration dieses Produktes wurde als optische Dichte bei 550 nm mittels Mikroplattenlesegerätes (SynergyMx, BioTek Instruments) gemessen. Die Kalziumkonzentration in jeder Probe wurde anhand einer Standardkurve berechnet.

2.2.2.3 Histologie (*Alizarinrot-Färbung*)

Das Anthrachinonderivat Alizarinrot S kann dazu verwendet werden, metallische Ionen, wie zum Beispiel Kalziumionen, durch Komplexbildung eines Alizarinrot S-Kalziumchelats zu detektieren. Die hier angewandte Methode folgt dem Protokoll von Gregory et al. (Gregory et al., 2004).

Nach Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd-Lösung, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, und zweimaliger Reinigung mit kaltem, entionisiertem Wasser wurden die Zellen zweimal mit 0,1 M Borinsäure (pH 4; Sigma) gewaschen. Anschließend wurde den Zellen 40 mM Alizarinrot-Lösung (Sigma) hinzugefügt.

Die Zellkulturplatten wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Das nicht gebundene Färbemittel wurde aspiriert und die Zellen wurden zweimal mit 0,1 M Borinsäure und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die gefärbten Monolayers wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie (Leica Microsystems) beurteilt. Die korrespondierenden Photos hierzu wurden mittels Kamera (Olympus TH4-100), Mikroskop (Olympus IX71) und dem Bildverarbeitungssystem Qcapture (Qimaging) kreiert.

2.2.2.4 RNA Isolierung und semi-quantitative RT-PCR

Eine semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde verwendet, um die Expression von Osteoblasten-zugehörigen Genen unter die Lupe zu nehmen. Hierbei wurden die Alkalische Phosphatase (AP), Runt-related Transkriptionsfaktor 2 (RunX2) und der Zinkfinger-beinhaltende Transkriptionsfaktor Osterix als frühe Knochenmarkergene an Tag 10 nach cCM-Exposition analysiert. Als späte Osteoblasten-spezifische Transkripte wurden die Expressionslevels des Osteopontins, Osteokalzins und des Bone Sialoproteins (BSP) am 21. Tag nach „Behandlung“ gemessen.

Für alle Schritte war es wichtig, die Proben vor Nukleasen zu schützen. Hierfür benutzte man stets Nuklease-freie Geräte und Lösungen sowie trug immer Handschuhe.

RNA-Extraktion aus den MSC und die Reinigung dieser durch Zentrifugieren wurde mittels *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Gehalt und die Qualität der totalen RNA wurden mithilfe des Nanodrop 1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific) bei 260 nm gemessen.

Die anschließende Reverse Transkription (RT) der RNA in die komplementäre DNA (cDNA) wurde mithilfe des *GoScript™ Reverse Transcription Systems* (Promega Corporation) laut deren Protokoll durchgeführt. Dabei wurde 1 µg totale RNA in jeder Gruppe mit „*Random Primern*“ (Promega) und der *GoScript™ Reverse Transcriptase* (Promega) in cDNA umgeschrieben.

Für die PCR wurden die cDNA-Proben vorerst mindestens 5-fach in Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Das qPCR-Reaktionsgemisch beinhaltete 30 ng cDNA in 5 µl cDNA und 7 µl Nuklease-freies Wasser, welches mit 0,2 µM Primer vorwärts, 0,2 µM Primer rückwärts und 12,5 µl 2X *SYBR Green PCR Master Mix buffer* (Applied Biosystems) zu einem finalen Volumen von 25 µl vermischt wurde. Die hier verwendeten PCR Primer sind in Tabelle 3 aufgelistet und wurden bei Life Technologies erworben.

Die qPCR lief in einem Thermozykler (Labrepco) mittels Stratagene Mx3000P QPCR System (SABiosciencesTM, Qiagen) ab. Vorerst wurde die cDNA-Probe auf 95°C für 10 Minuten erhitzt und dadurch denaturiert. 40 Amplifikationszyklen folgten. Jeder Zyklus enthielt drei Schritte: 95°C für 30 Sekunden, 55°C für 60 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden. Schmelzkurvenanalysen wurden am Ende jeden Amplifikationsschrittes durchgeführt.

Um unerwünschte Nebeneffekte zu reduzieren, die durch verschiedene, initiale RNA-Konzentrationen oder eventuelle Ungleichmäßigkeiten innerhalb der Proben hervorgerufen

werden konnten, wurden alle hier genannten Gene zur 18S-rRNA als Referenz-Hauskeeping-Gen normalisiert. Die mRNA-Expressionslevels wurden als relative Werte dargestellt, die mittels 2-delta-CT-Methode ($\Delta\Delta CT$) (Livak et al., 2001) im Vergleich zu den Werten der Kontrollzellen ermittelt wurden.

Gene	Zugangsnummer	Primersequenz 5'-3'	Produktgröße (bp)	Primer-effizienz
AP	NM 000478	F : CGTGGCTAAGAACATGTCATCATGTT R: CGTGGCTAAGAACATGTCATCATGTT	90	97%
RunX2	NM 001024630	F: GCCTTCAAGGTGGTAGCCC R: CGTTACCCGCCATGACAGTA	67	96%
Osterix	NM 152860	F : TGCCCCAGTGTCTACACCTCTC R : AGTGTCCCTTGCAGCCCCATC	181	100%
Osteopontin	NM 001040058	F: CCAAGTAAGTCCAACGAAAG R : GGTGATGTCCTCGTCTGTA	348	91%
Bone Sialoprotein	NM 004967	F: GGCCTGTGCTTCTCAATGAA R : GCCTGTACTTAAAGACCCATTTC	83	87%
Osteokalzin	NM 199173	F : GTAGTGAAGAGACCCAGGCG R : ATTGAGCTCACACACCTCCC	99	97%
18S-RNA	NR 003286	F : CGGCTACCACATCCAAGGAA R : CGGCTACCACATCCAAGGAA	187	98%

Tabelle 3: Liste und Sequenzen der Primer, die für die Analyse der mRNA-Expression verwendet wurden. Alle Sequenzen gelten für humane Gene. Primer vorwärts (F). Primer rückwärts (R). (Ferreira et al., 2013)

2.2.3 Analyse der Chondrogenese

2.2.3.1 Quantifizierung der Glykosaminoglykane

Um die Entwicklung eines chondrogenen Phänotyps quantitativ zu beurteilen, wurde der Glykosaminoglykangehalt (GAG) am 28. Tag nach cCM-Exposition bestimmt.

Hierfür wurden die Pellets zweifach mit PBS gewaschen und in 200 µl große Proben mit Papain (Sigma-Aldrich) enthaltenem Digestionspuffer transferiert. Über Nacht wurden die Proben bei 60°C inkubiert. Zur Quantifizierung der GAG-Konzentration wurde das *DMMB Dye Binding Assay* (Farndale et al., 1986) herangezogen. Die dahinter liegende Therorie beruht auf einem Wechsel des Absorptionsspektrums des DMMB Dye bei Komplexbildung mit GAG.

30 µl der Proben wurden hierfür mit 200 µl DMMB Lösung (Sigma-Aldrich) vermischt, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die optische Dichte wurde mittels Mikroplattenlesegerätes (SynergyMx, BioTek Instruments) bei 525nm gemessen. Mithilfe einer Standardkurve von Chondroitinsulfat (Herkunft: Haifischflossenknorpel; Sigma-Aldrich) wurde die GAG-Konzentration errechnet und mit dem jeweiligen DNA-Gehalt einer Probe normalisiert.

2.2.3.2 Histologie (Toluidinblau-Färbung)

Zellaggregate wurden für 30 Minuten bei 4°C in 4% Paraformaldehyd fixiert, für eine bessere Handhabung in 0,5% Agarosegel gegossen, in Paraffin eingebettet und schließlich in 5 µm dicke Präparate mittels Kryostaten geschnitten.

Die Schnittpräparate wurden auf Objektträger aufgezogen, mittels 3 Xylol-Waschvorgängen für jeweils 5 Minuten entparaffinisiert und in abgestuften Ethanollösungen rehydriert.

Um die Matrixproteoglykane in den chondrogenen Pellets aufzudecken, wurden repräsentative Schnitte mit 1% Toluidinblau (pH 3,0; Sigma-Aldrich) angefärbt. Die Färbezeit betrug 30 Minuten. Die Objektträger wurden in entionisiertem Wasser gewaschen, in abgestuften Ethanollösungen dehydriert und wieder 3 Mal mit Xylol gereinigt. Schließlich wurden die Schnittpräparate mit *CytosealTM XYL mounting medium* überzogen (Thermo Fisher Scientific).

Die gefärbten Schnitte wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie (Leica Microsystems) beurteilt. Repräsentative Photos wurden, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, hergestellt.

2.2.4 Analyse der Adipogenese

2.2.4.1 Histologie (Oil Red O-Färbung)

Zur Analyse einer adipogenen Differenzierung der hBMSC wurden die Kulturen mittels etablierten Protokollen mit Oil Red O angefärbt und histologisch beurteilt (Dennis et al., Cells Tissues Organs 2002).

Die Zellen wurden zweimal mit 1X PBS gewaschen und anschließend mit 400 µl/well 4% Paraformaldehyd (pH 7,4; Sigma-Aldrich) beimpft. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit 500 µl/well destilliertem Wasser gewaschen. Eine 5-minütige Inkubation in 400 µl/well 60% Isopropanol bei Raumtemperatur folgte. Schließlich wurde den Zellen 400 µl/well Oil Red O Lösung (Sigma) hinzugefügt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 500 µl/well destilliertem Wasser gewaschen. Die gefärbten Monolayers wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie visualisiert.

2.3 Statistik

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Experimente mit hBMSC-Isolaten von mindestens 2 der 3 verschiedenen Spendern (Tabelle 2) in dreifacher Ausführung durchgeführt. Repräsentative Datensätze der Versuchsergebnisse werden gezeigt.

Alle quantitativen Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Innerhalb eines einzelnen Versuches wurden statistische Signifikanzen zwischen den Behandlungsgruppen unter Verwendung eines zweiseitigen, ungepaarten Student-T-Tests berechnet. Dabei galten p-Werte <0,05 als statistisch signifikant.

3 Ergebnisse

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Studie liegt auf der Ermittlung des Effekts des aus MSC-Kulturen gesammelten CM auf die MSC-Differenzierung zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen *in vitro*. Die Differenzierung entlang jeder von diesen Zellreihen erfordert u.a. den Zusatz von Dexamethason.

Ziel war es, durch geeignete Experimente herauszufinden, ob und wie die im CM vorhandenen autokrinen sowie parakrinen Faktoren die Differenzierung beeinflussen.

3.1 Vorversuche

3.1.1 Der Effekt unverarbeiteten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Osteogenese der hBMSC

Initial wurde unverändertes CM für die Experimente verwendet. Dieses CM, einschließlich verschiedener Verdünnungsreihen, wurde den hBMSC-Empfängerkulturen hinzugefügt, um die Effekte auf das Überleben der Zellen und auf die Dexamethason-induzierte Osteogenese zu untersuchen (Abbildung 6).

Die Quantifizierung der DNA als Maß für das Überleben der am Plastik adhärenten Zellen ist wichtig, um sicherzustellen, dass jeglicher, inhibitorisch auftretender Effekt des CM auf die Differenzierung der hBMSC nicht aufgrund von Toxizität oder Wachstumshemmung erfolgte.

Der Vorversuch zeigte allerdings, dass erhöhte Konzentrationen an CM den DNA-Gehalt/well reduzierten (Abbildung 7A). Mit anderen Worten hemmte das CM die Vermehrung der hBMSC während der 3-wöchigen Zellkultur. Ein Mangel an Nährstoffen und Serum sowie eine Übersäuerung des Zellkulturmediums als ein Ergebnis von Stoffwechselvorgängen (und erhöhtem Kohlendioxid Partialdruck) waren hierfür vermutlich ursächlich.

Obwohl das CM die Zellproliferation minimierte, hatte es interesserweise keine Auswirkung auf die Fähigkeit dieser Zellen, AP und eine mineralisierte Matrix als Reaktion auf die Dexamethason-Behandlung zu bilden (Abbildung 7B, Abbildung 7C).

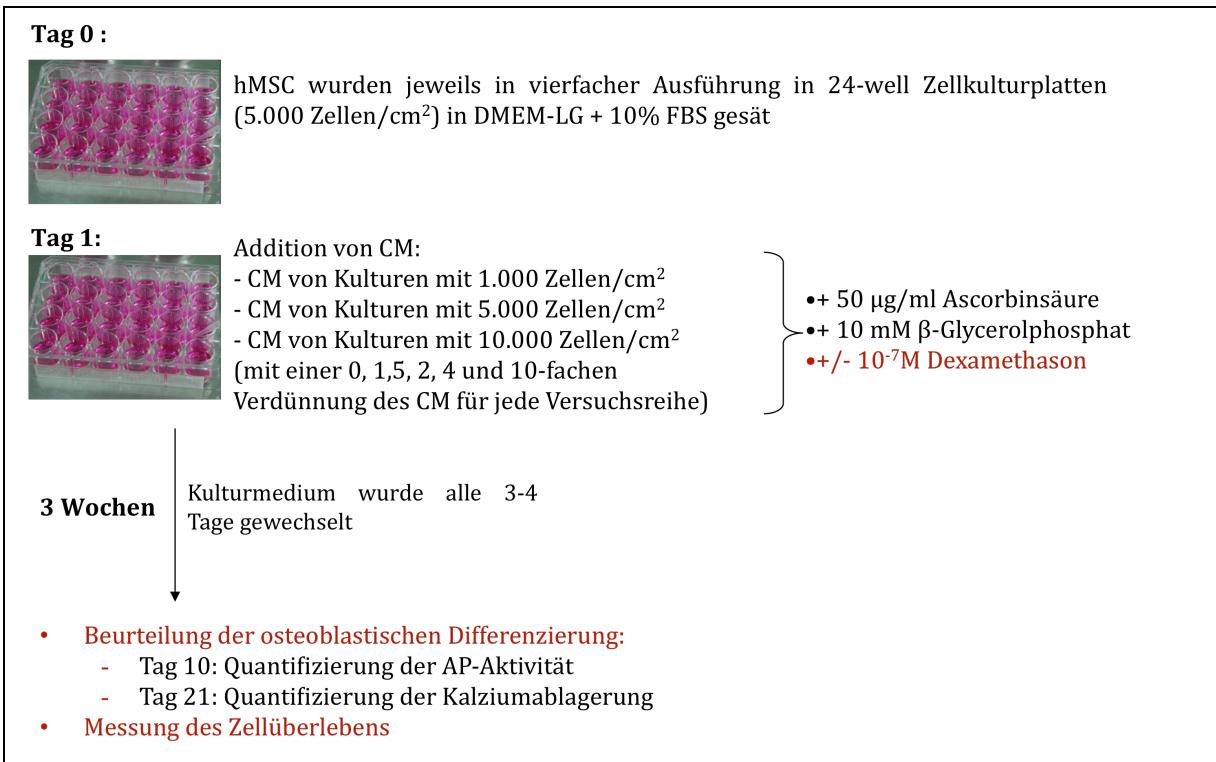


Abbildung 6: Experimentelles Design, um den Effekt unbearbeiteten CM auf Dexamethason-induzierte Osteoblastendifferenzierung der hBMSC zu testen

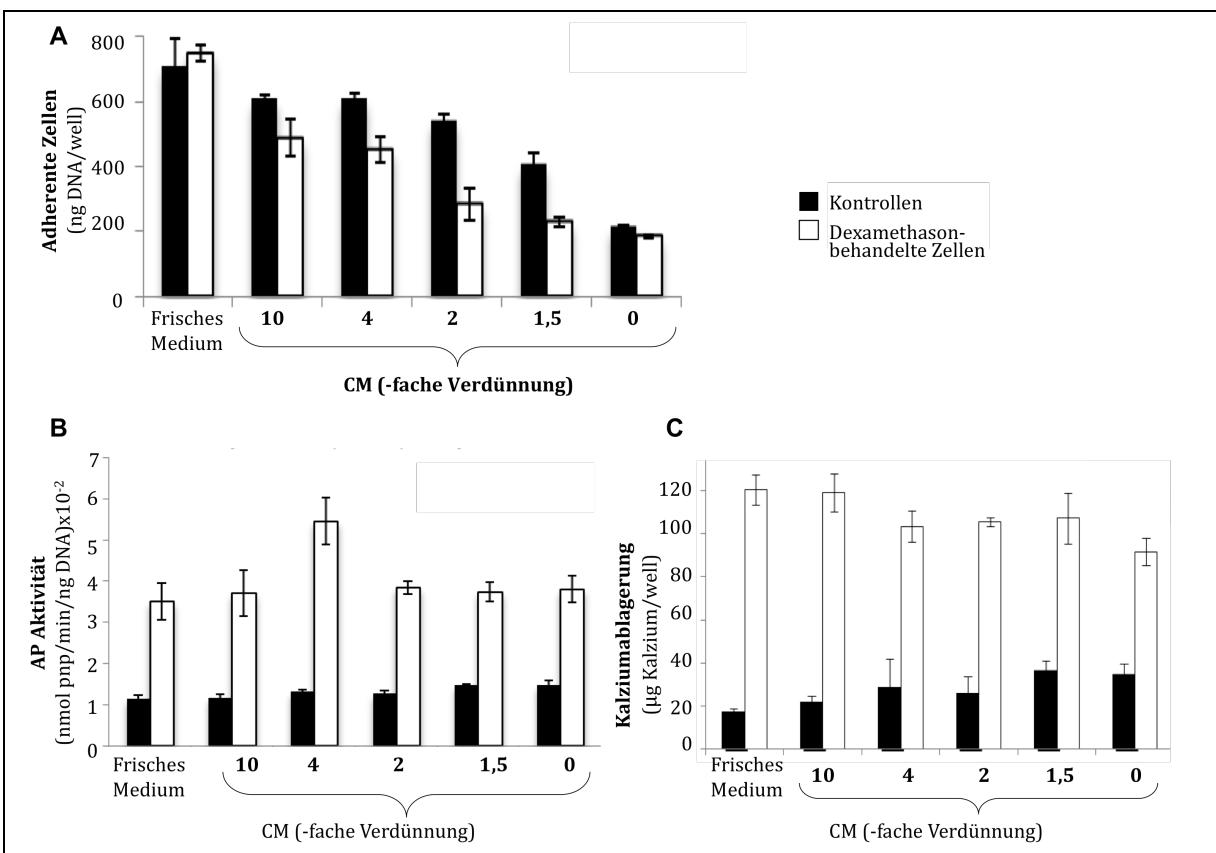


Abbildung 7: (A) Der Effekt des CM auf den DNA-Gehalt der hBMSC-Monolayerkulturen unter osteoblastischen Kulturbedingungen. (B) Der Effekt des CM auf Dexamethason-induzierte Aktivität der AP der hBMSC. (C) Der Effekt des CM auf Dexamethason-induzierte *in vitro* Mineralisierung der hBMSC.

3.1.2 Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf das Zellüberleben der hBMSC unter osteoblastischen Kulturbedingungen

Aufgrund des nachteiligen Effekts des unverarbeiteten CM auf die Zellproliferation der hBMSC war ein anderer Ansatz notwendig, um den Effekt von ausgeschütteten Faktoren auf die Dexamethason-induzierte Osteogenese zu untersuchen. Vermutlich waren ein Mangel an Nährstoffen und die Ansammlung von kleinen, säurehaltigen Zwischenprodukten des Stoffwechsels innerhalb des CM für die Wachstumshemmung verantwortlich.

Zur Entfernung der kleinen Metabolite wurde das CM konzentriert, wie unter 2.1.3 beschrieben. Das Konzentrat wurde dann mit frischem Medium gemischt, um ihm erneut Nährstoffe und frisches Serum zuzufügen.

Der Effekt des cCM auf das Überleben der hBMSC während Dexamethason-induzierter Osteogenese wurde daraufhin untersucht (Abbildung 8).

Es stellte sich heraus, dass das cCM die Zellproliferation in An- oder Abwesenheit von Dexamethason nicht beeinträchtigte (Abbildung 9). Dieses Ergebnis erlaubte es, dass die folgenden Versuche ohne Einschränkung mit cCM durchgeführt werden konnten.

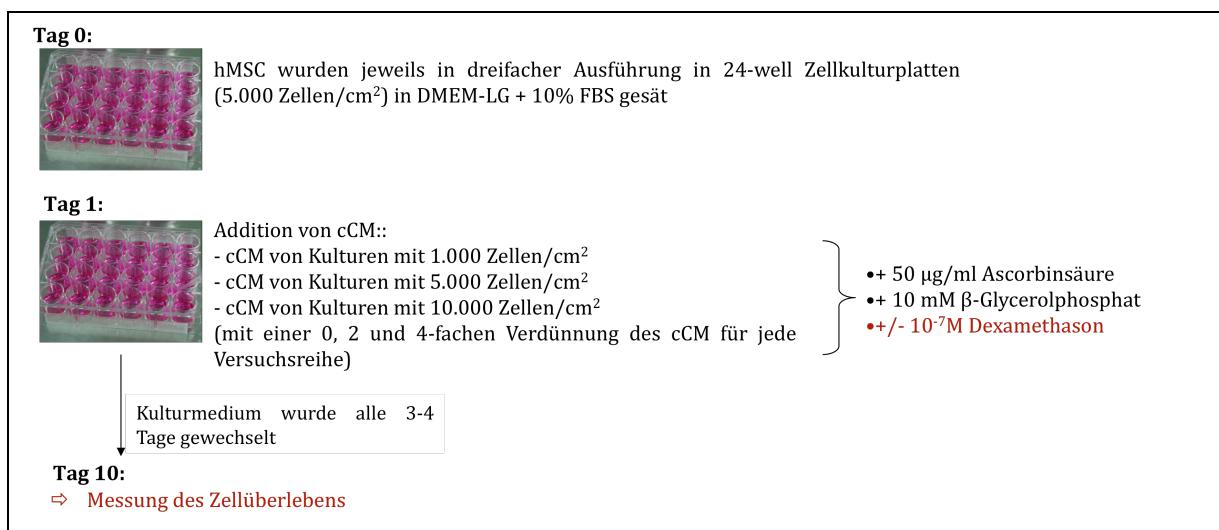


Abbildung 8: Experimentelles Design, um den Effekt des cCM auf das Zellüberleben der hBMSC unter osteoblastischen Kulturbedingungen zu testen

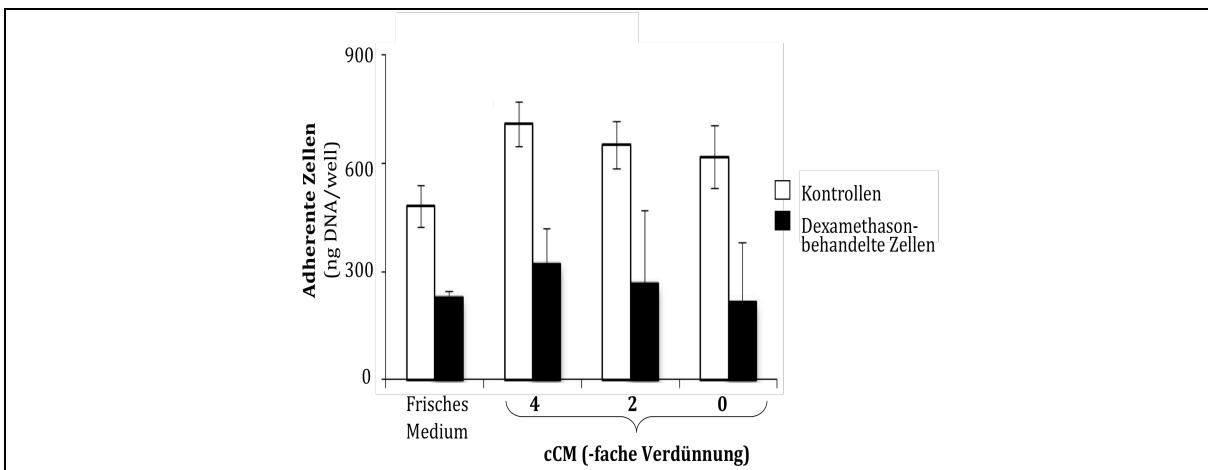


Abbildung 9: Der Effekt des cCM auf den DNA-Gehalt der hBMSC-Monolayerkulturen unter osteoblastischen Kulturbedingungen

3.2 Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Dreilinien-Differenzierung der hBMSC

Die Ergebnisse der Abbildung 9 bestätigen, dass die neue Methode, cCM anstelle von CM zu verwenden, die Zellproliferation nicht negativ beeinflusste. Im Folgenden wurden die Effekte des cCM auf die osteoblastische, chondrozytische und adipozytische Differenzierung der hBMSC untersucht.

3.2.1 Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Osteogenese der hBMSC

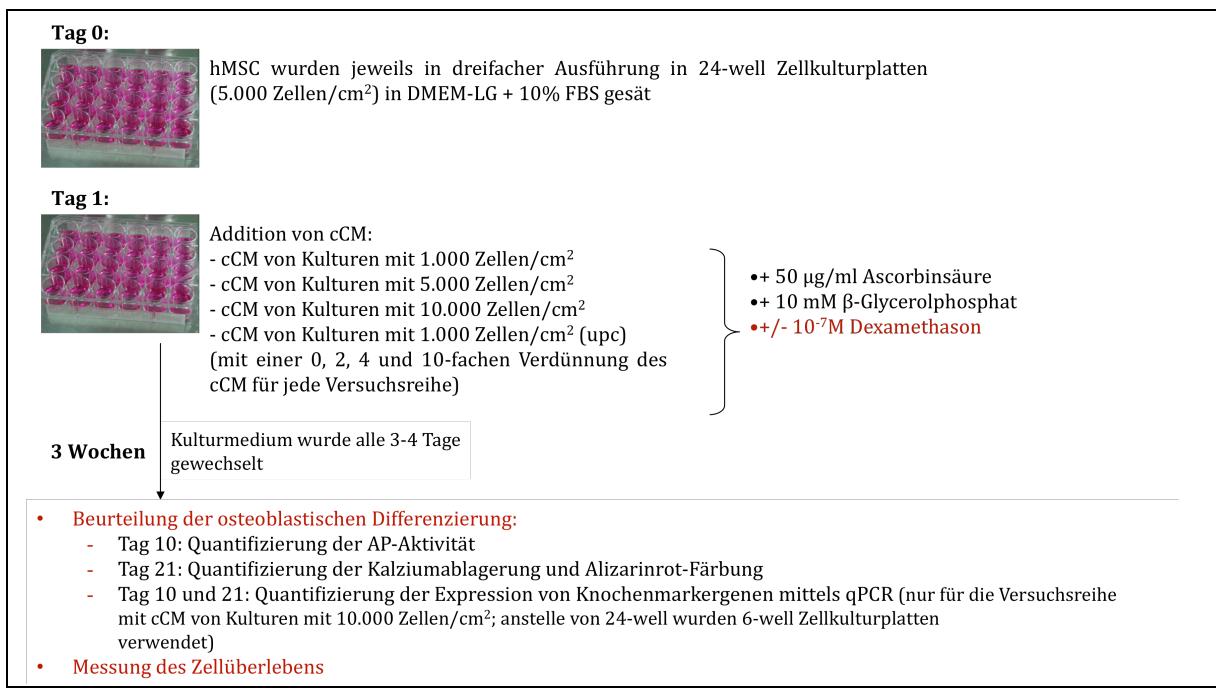


Abbildung 10: Experimentelles Design zur osteogenen Differenzierung der hBMSC. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Der Effekt des cCM auf Dexamethason-induzierte Osteogenese der hBMSC wurde untersucht (Abbildung 10).

Die Induktion der AP, deren Aktivität am 10. Tag nach Dexamethason-Behandlung gemessen wurde, ist ein früher Marker der osteoblastären Differenzierung.

Wie erwartet, erhöhten Dexamethason-behandelte Zellen im Vergleich zu den Kontrollen die AP-Aktivität um das 4 bis 9-fache (Abbildung 11). In einer dosisabhängigen Weise erhöhte cCM die Induktion der AP als Reaktion auf die Zugabe von Dexamethason. Je geringer das cCM verdünnt war, desto höher war die Aktivität der AP. Dieser synergistische Effekt trat bei jeder untersuchten Zellsaatdichte auf. Der stärkste Effekt wurde in der Versuchsgruppe mit der niedrigsten Dichte ($1.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$) deutlich. Das cCM von Zellen, die bis zu einer Konfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren konnten, hatte allerdings nur eine geringe Auswirkung auf die Induktion der AP (Abbildung 11).

Der Effekt des cCM auf Dexamethason-induzierte *in vitro* Mineralisierung wurde an Tag 21 nach Dexamethason-Zugabe gemessen. Die Auswirkungen des cCM waren interessanterweise abhängig von der Dichte, in der die Spender-MSC initial gesät worden waren (Abbildung 12).

Das cCM von Zellen mit der niedrigsten Zellsaattdichte ($1.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$) hemmte die Mineralablagerung stark. Auch bei 10-facher Verdünnung inhibierte dieses cCM die Mineralisierung bis über 90%. Das cCM von Zellen mit einer initialen Zellsaattdichte von $5.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$ hemmte die Kalziumablagerung ebenfalls, jedoch weniger stark als zuvor: Maximale Hemmung war hier bei ca. 50% erreicht. Im Gegenzug dazu steigerte das von Zellen mit der höchsten Zellaatdichte ($10.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$) gewonnene cCM markant die Ablagerung von Kalzium. Ein ca. 4-facher Anstieg war bei unverdünnter cCM-Konzentration zu beobachten.

Die Alizarinrot-Färbung bestätigte ebenfalls, dass das cCM von Zellen mit niedriger Saatdichte die Kalziumablagerung stärker inhibierte als das cCM von Zellen mit höherer Saatdichte (Detail nicht gezeigt).

Die hier beschriebenen inhibitorischen Effekte des cCM von Zellen mit einer niedrigen Ursprungszelldichte (1.000 und $5.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$) auf die die Mineralisierung lassen sich für die Aktivität der AP (Abbildung 11, Abbildung 12) nicht darstellen. Dies spricht dafür, dass eher ein spezifischer Inhibitor der Mineralisierung als ein Inhibitor der Differenzierung im cCM vorhanden ist.

Um diesem Phänomen nachzugehen, wurde der Effekt des cCM von Zellen mit der höchsten Beimpfungsrate ($10.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$) auf die Expression von Dexamethason-induzierten Markergenen der osteoblastären Differenzierung an Tag 10 und 21 mittels qPCR geprüft. Die Expressionslevel der AP, des RunX2 und des Osterix wurden an Tag 10, die des Osteokalzins, Osteopontins und Bone Sialoproteins an Tag 21 nach Dexamethason-Behandlung determiniert.

In vielen Laboren wird Dexamethason dazu verwendet, die *in vitro*-Differenzierung der MSC zu Osteoblasten zu induzieren. Jedoch zeigen unsere PCR-Daten, dass Dexamethason keine Osteogenese im eigentlichen Sinn bewirkt. Der Level der mRNA zeigte einen starken Anstieg für die Transkripte der AP und einen moderaten Anstieg für die des RunX2. Allerdings war nur eine minimale Induktion anderer Osteogenesemarkergene zu beobachten, dies galt auch für Osterix, Osteopontin, Osteokalzin und Bone Sialoprotein (Abbildung 13).

Insgesamt hatte das cCM geringe Auswirkungen auf die Menge an mRNA-Transkripten. Dies lässt vermuten, dass die Effekte des cCM auf die AP-Aktivität und Mineralisierung eher auf

spezifischen Wirkzusammenhängen bei diesen Prozessen als auf direkten Differenzierungseffekten basiert.

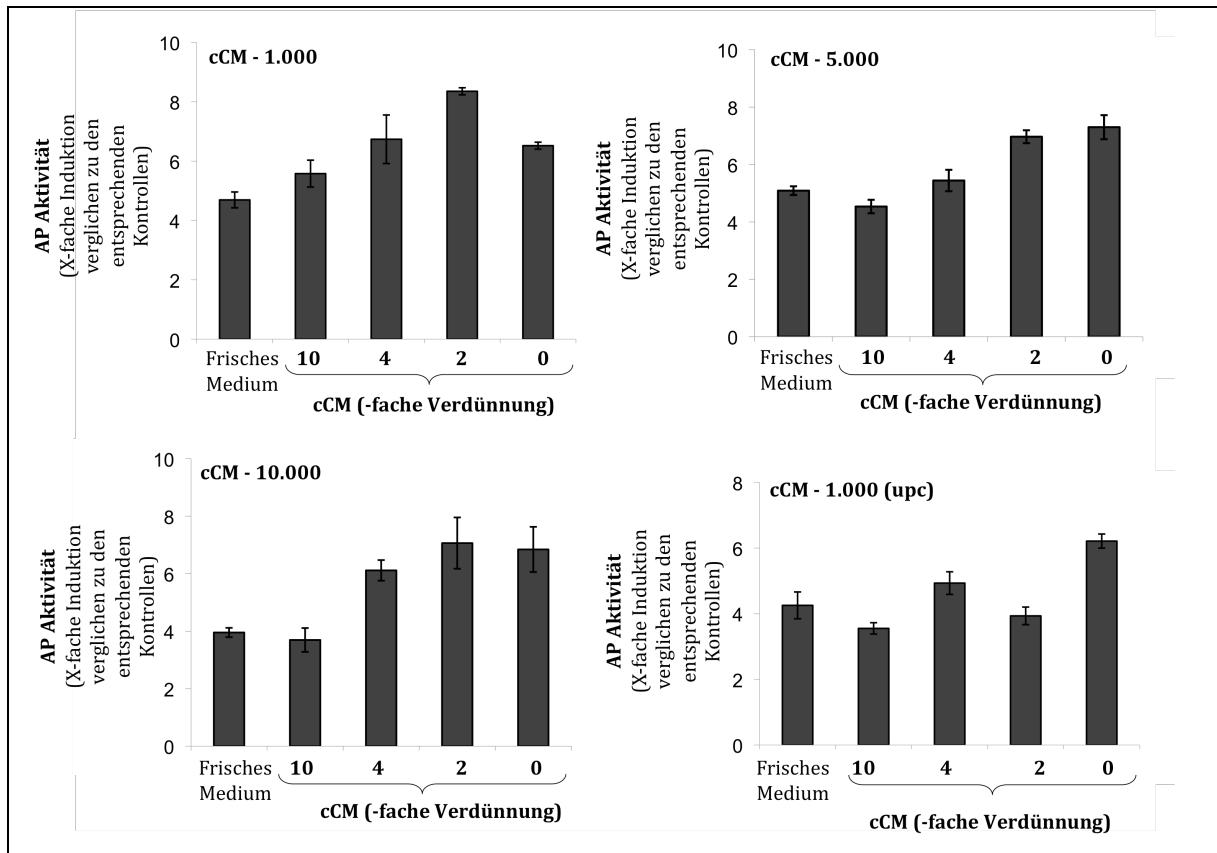


Abbildung 11: Der Effekt des cCM auf Dexamethason-induzierte AP-Aktivität der hBMSC.
Die Graphen repräsentieren für jede einzelne cCM-Verdünnung die x-fache Induktion der AP in Dexamethason-behandelten Zellen mit cCM im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen in Abwesenheit von Dexamethason. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

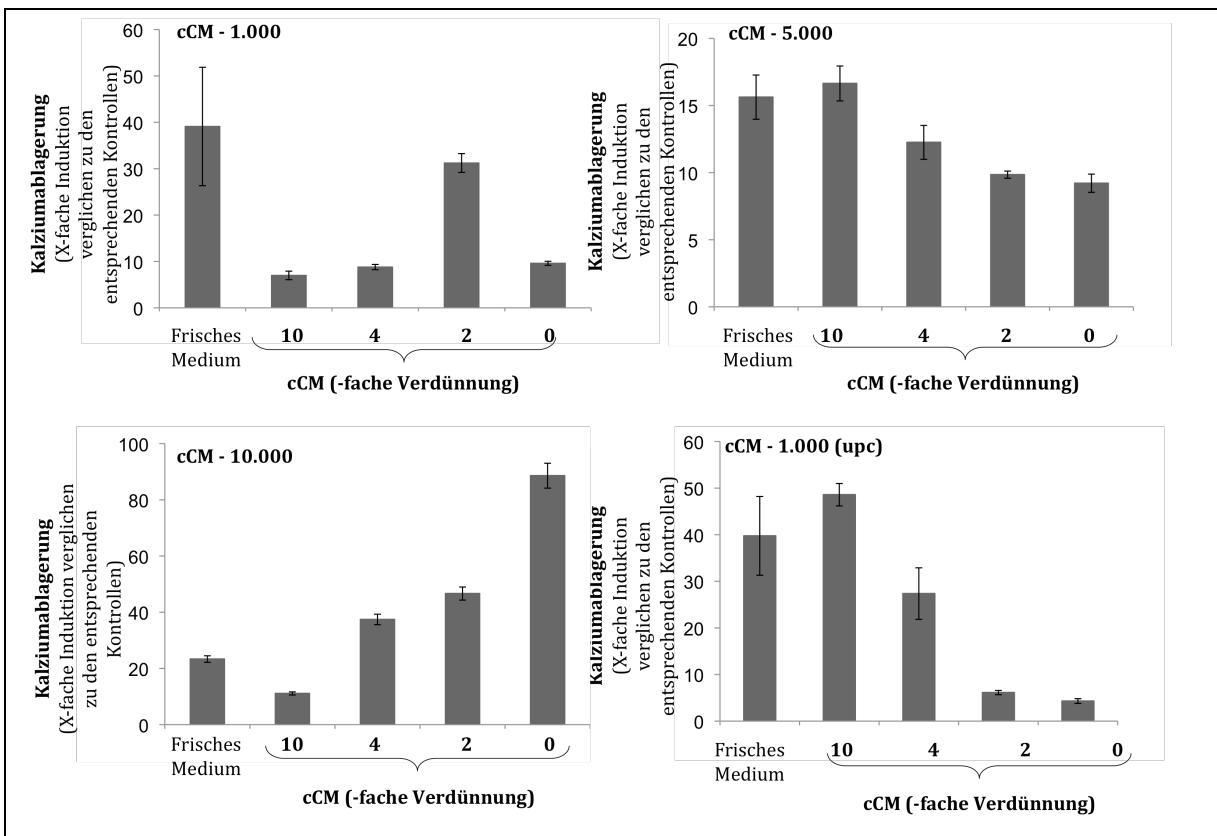


Abbildung 12: Der Effekt des cCM auf Dexamethason-induzierte *in vitro*-Mineralisierung der hBMS. Die Graphen repräsentieren für jede einzelne cCM-Verdünnung die x-fache Induktion der AP in Dexamethason-behandelten Zellen mit cCM im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen in Abwesenheit von Dexamethason. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

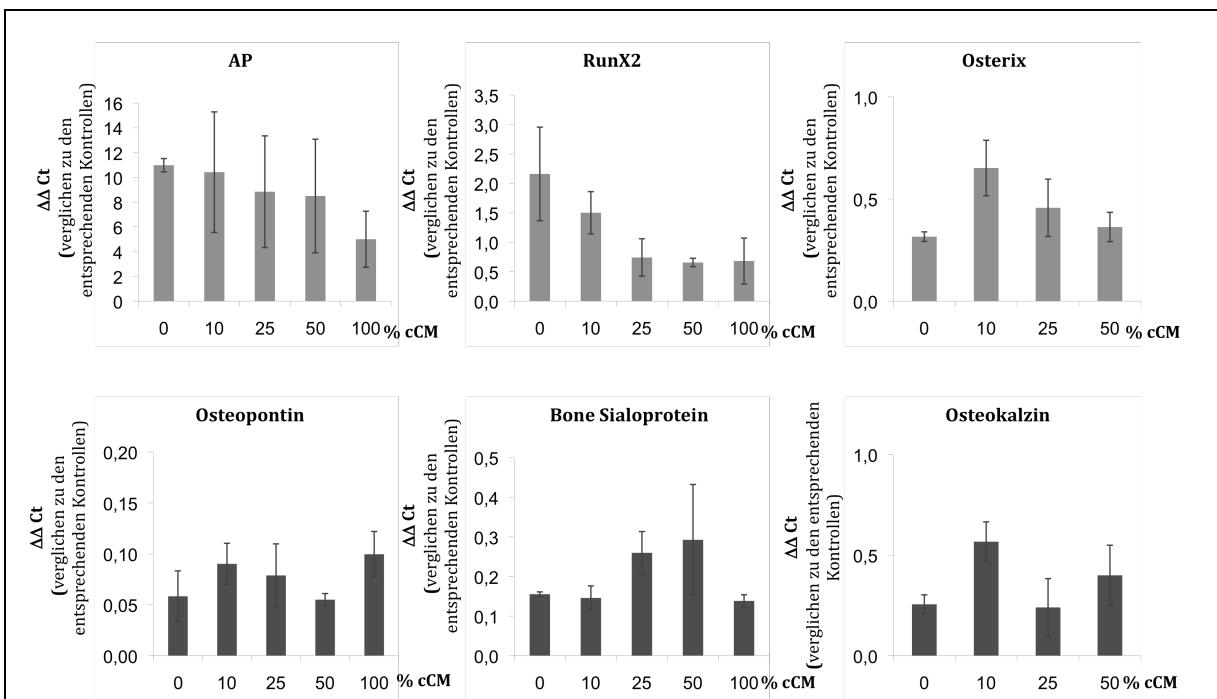


Abbildung 13: Der Effekt des cCM aus dicht gesäten Kulturen ($10.000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$) auf Dexamethason-induzierte Knochenmarkergenexpression der hbMSC an Tag 10 (obere Reihe) und Tag 21 (untere Reihe), verglichen zu den entsprechenden Kontrollen ohne Dexamethazonzugabe.

3.2.2 Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Chondrogenese der hBMSC

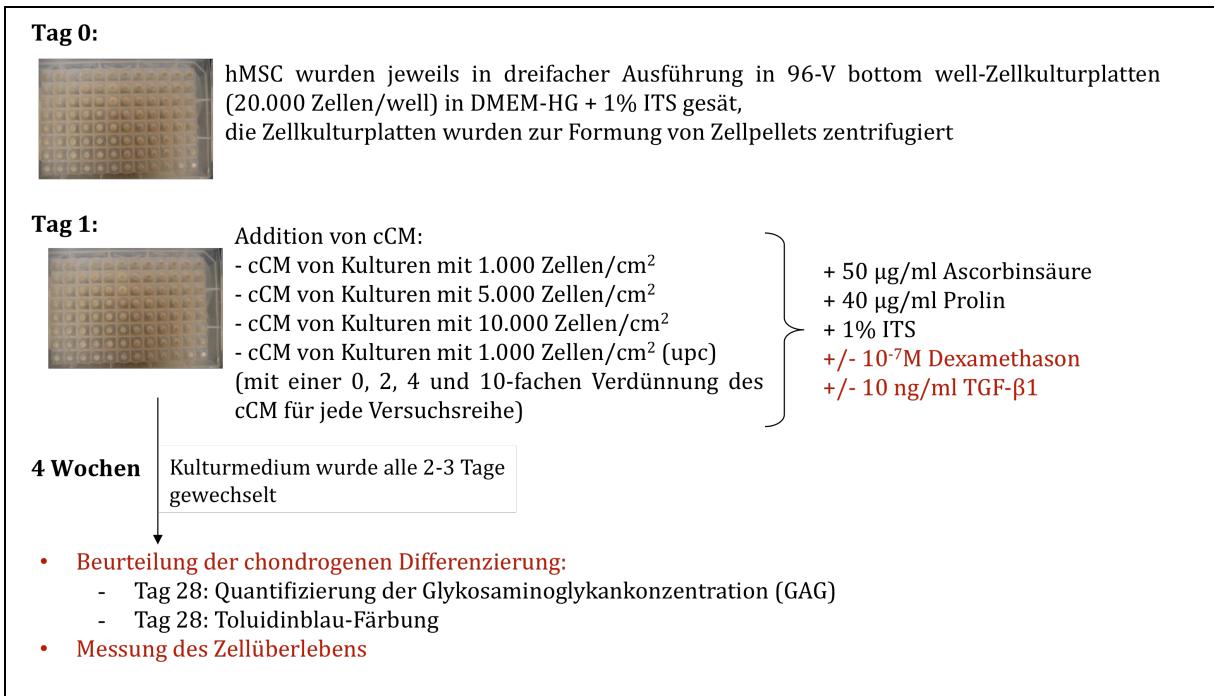


Abbildung 14: Experimentelles Design zur chondrogenen Differenzierung der hBMSC. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Der Effekt des cCM auf die Chondrogenese wurde durch Quantifizierung des Gehalts an Glykosaminoglykanen (GAG) in den Zellpellets an Tag 28 nach Inkubation mit Dexamethason oder TGF-β1 oder einer Kombination von Dexamethason und TGF-β1 überprüft (Abbildung 14). Der DNA-Gehalt der Pellets war unter allen drei Versuchsgruppen unbeeinflusst (Abbildung 15). Wie erwartet zeigt Abbildung 16, dass Dexamethason und TGF-β1 zusammen für eine vollständige Chondrogenese notwendig sind; die Kombination von Dexamethason und TGF-β1 erhöhte die Konzentration an GAG in den Pellets um das 30-fache. Es zeigte sich außerdem, dass TGF-β1 alleine ein gering höheres Potenzial als Differenzierungsinduktor hatte als Dexamethason alleine. Die mit Toluidinblau gefärbten Proben veranschaulichen dies.

Abbildung 17 verdeutlicht, dass cCM den GAG-Gehalt von Dexamethason- und TGF-β1-stimulierten Zellen in einer dosisabhängigen Weise stark vermindert. Das cCM der Versuchsgruppe mit der ursprünglich höchsten Zellsaatdichte (10.000 Zellen/cm²) wies den stärksten Abfall des GAG-Gehalts auf. Unverdünntes cCM führte hierbei zu einer ca. 5-fach geringeren GAG-Konzentration als frisches Zellmedium.

Zusammengefasst legen die Ergebnisse nahe, dass cCM unabhängig von der ausgehenden Zellsaatdichte einen konstant inhibitorischen Effekt auf die Dexamethason- und TGF-β1-inizierte Chondrogenese hatte.

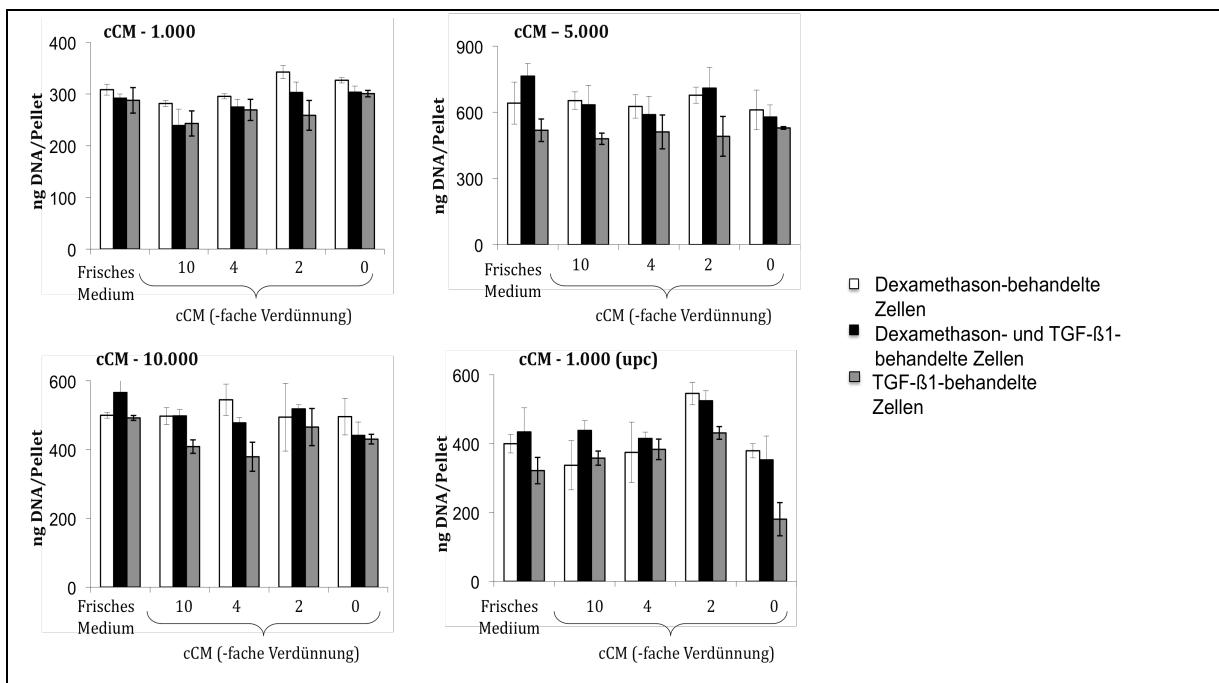
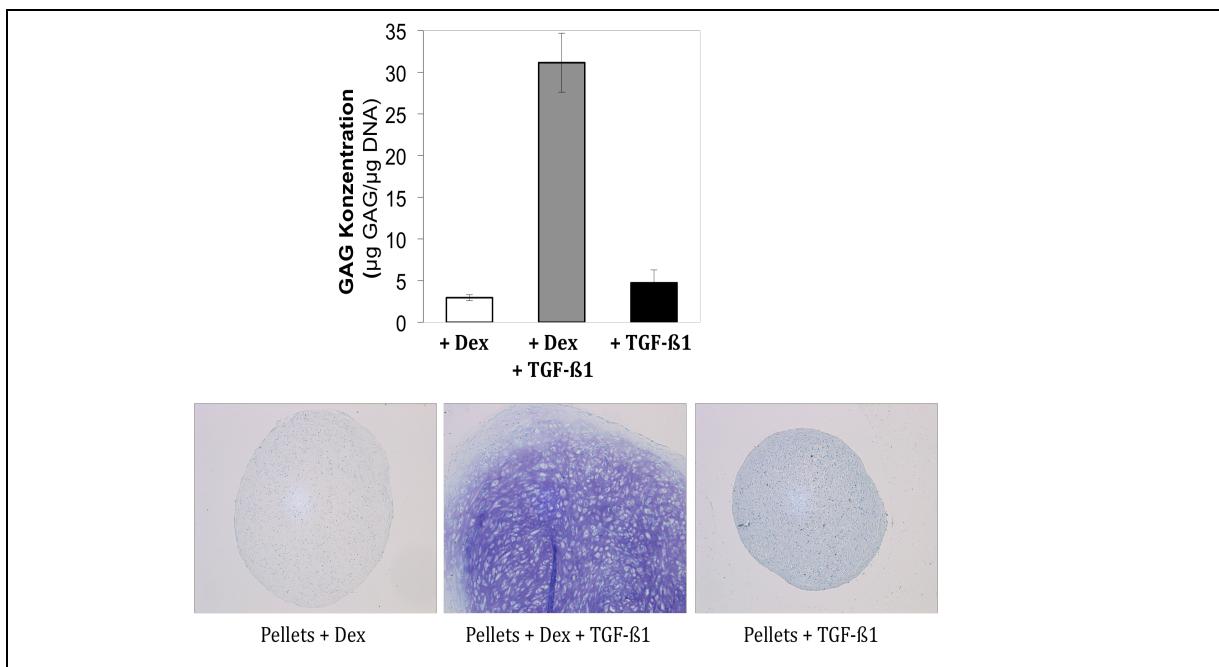


Abbildung 15: Der Effekt des cCM auf den DNA-Gehalt der hBMSC-Pellets unter chondrogenen Kulturbedingungen. (upc) heißtt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.



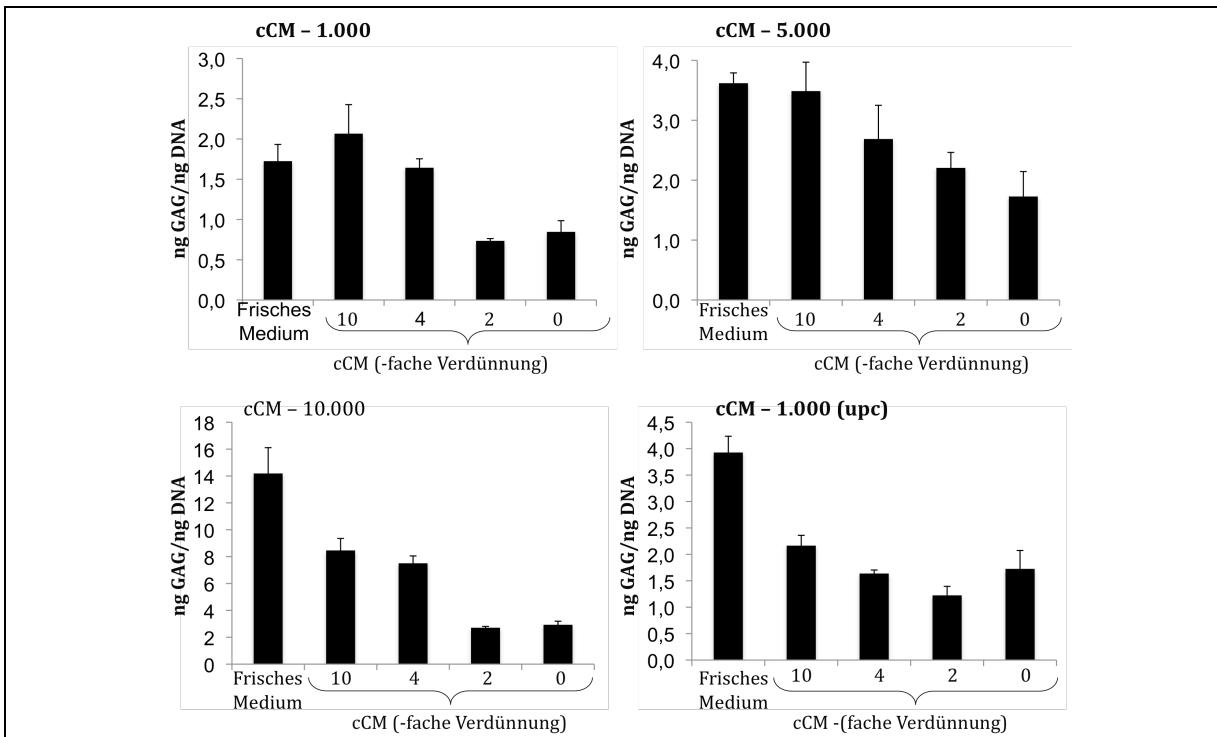


Abbildung 17: Der Effekt des cCM auf Dexamethason- und TGF- β 1-induzierte Chondrogenese der hBMSC. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

3.2.3 Der Effekt konzentrierten, konditionierten Mediums auf Dexamethason-induzierte Adipogenese der hBMSC

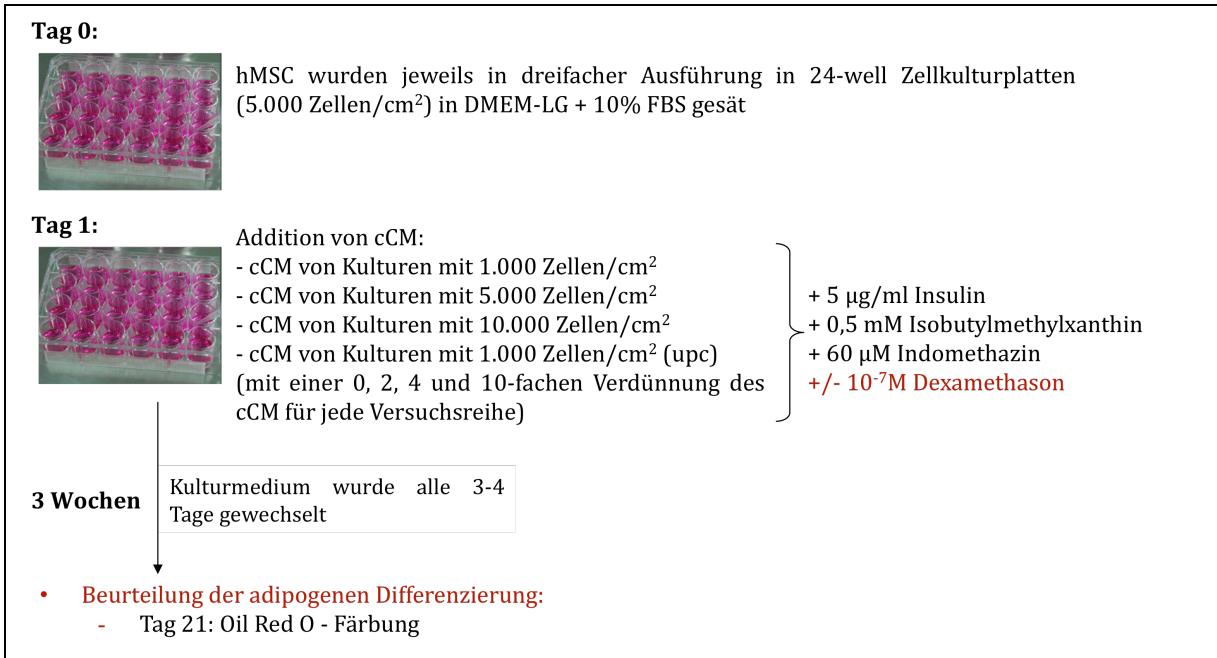


Abbildung 18: Experimentelles Design zur adipogenen Differenzierung der hBMSC. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Um die Effekte des cCM auf Dexamethason-induzierte Adipogenese zu untersuchen, wurden die humanen Stammzellen in adipogenem Wachstumsmedium einschließlich Dexamethason (Positivkontrolle) oder ohne Dexamethason (Negativkontrolle) kultiviert. Zu den Positivkontrollen wurde unverdünntes cCM, 2-, 4-, oder 10-fach verdünntes cCM hinzugefügt (Abbildung 18).

Abbildung 19 zeigt repräsentative Bilder von hBMSC, die unter diesen Bedingungen kultiviert wurden. Die Bilder betonen die Fettvakuolen, die durch die Dexamethason-abhängige Adipogenese entstanden und zur histologischen Beurteilung mittels Oil Red O-Lösung rot angefärbt wurden.

In adipogenem Wachstumsmedium ohne Dexamethason bildeten die Stammzellen keine Fettvakuolen. Die Anwesenheit Dexamethasons in frischem Zellmedium induzierte einen starken Anstieg in der Fettvakuolen-Bildung. Das cCM hingegen übte einen dosisabhängigen, inhibitorischen Effekt auf die Adipogenese aus (Abbildung 19). Je höher die Konzentration des cCM war, desto stärker war die Hemmung der Bildung von Lipidvakuolen. Ähnliche Ergebnisse erhielten wir mit jeder der 4 getesteten Zellsaatdichtegruppen.

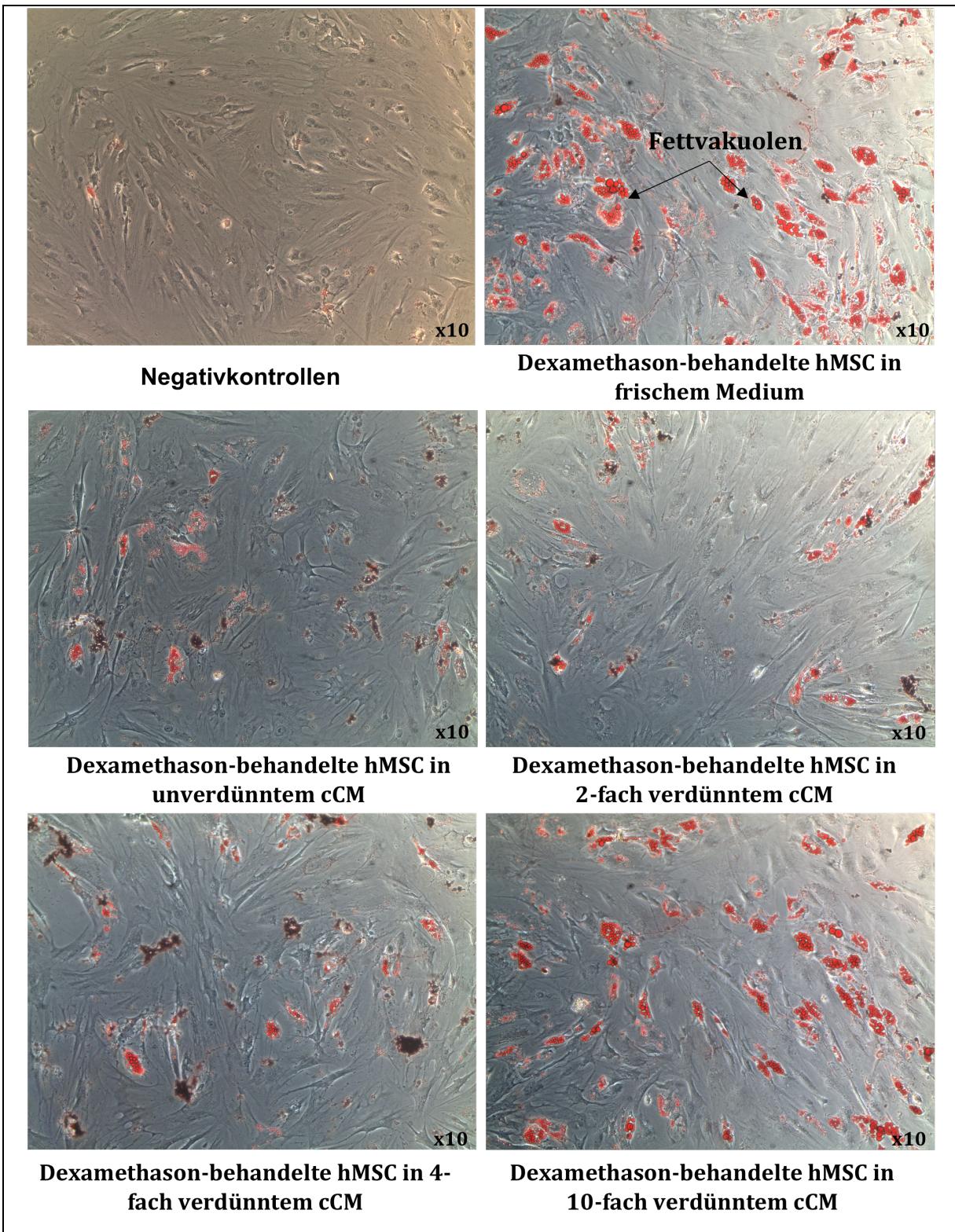


Abbildung 19: Der Effekt des cCM auf Dexamethason-induzierte Adipogenese der hBMSC, mittels Oil Red O-Färbung dargestellt

3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Daten zeigen, dass die Faktoren, die von den humanen MSC gebildet und ausgeschüttet werden, die Chondrogenese und Adipogenese unter allen Kulturbedingungen inhibierten. Diese Ergebnisse sind kohärent mit der Hypothese.

Im Fall der Osteogenese stellt sich die Lage nicht so klar dar, die Ergebnisse waren uneinheitlicher als zuvor. Die Effekte des cCM auf den Grad der Mineralisierung waren von der initialen Zellsaatdichte der Spender-hBMSC-Kulturen abhängig. Die Zugabe von cCM steigerte die Dexamethason-induzierte Enzymaktivität der AP. Der cCM-Zusatz beeinflusste auf mRNA-Level die Dexamethason-stimulierte Induktion der AP allerdings kaum. Dexamethason hatte, abgesehen von einem geringen Anstieg in der Induktion des RunX2-Transkripts, keinen wesentlichen Effekt auf die Expression anderer Osteogenesemarker. Die cCM-Zugabe änderte dies nicht.

Die vorliegende Arbeit identifiziert limitierte Effekte des Dexamethasons. Das Glukokortikoid war nicht in der Lage, einen komplett osteoblastischen Phänotyp zu induzieren, obwohl es einen starken Induktor der AP und der Mineralisierung darstellt.

4 Diskussion

4.1 Die Bildung und Ausschüttung autokriner und parakriner *stemness*-Faktoren durch hBMSC

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Hypothese, dass humane MSC aus dem Knochenmark ihre Differenzierung in andere Zelltypen hemmen und sich somit selbst als multipotente Stammzellen halten können, indem sie bestimmte lösliche Faktoren produzieren und ausschütten. Dies könnte unser Verständnis über die biologischen Eigenschaften der MSC erhöhen und Informationen mit hoher Relevanz für klinische Protokolle im Bereich des Tissue Engineering liefern. Für die klinische Anwendung ist es unabdingbar notwendig, *in vitro* eine große Anzahl an MSC zu gewinnen und diese anschließend in die gewünschte Richtung zu differenzieren.

Diese Konzepte sind nicht neu. 2010 schrieben Kuhn et al. in ihrem Review Paper (Kuhn et al., 2010):

*“Identification of the intrinsic and extrinsic regulatory factors that maintain their “stemness” properties is desirable, not only to understand MSC biology *in vivo*, but also for their practical purposes of producing sufficient quantities of MSCs for their therapeutic applications”.*

Trotz der zentralen klinischen Bedeutung dieser Konzepte existieren erstaunlich wenige Arbeiten in diesem Bereich. Insbesondere verwundert es, dass bisher Publikationen zu vergleichbaren Untersuchungen wie in der vorliegenden Arbeit fehlen.

Die hier präsentierten Daten zeigen überzeugend, dass hBMSC-Kulturen lösliche Faktoren bilden, die, entsprechend der Hypothese, die Differenzierung anderer hBMSC zu Chondrozyten und Adipozyten hemmen. Dies trat unter allen getesteten Zellsattdichten der Spender-hBMSC auf.

Die Experimente zur Untersuchung der Effekte des hBMSC-CM auf die Osteogenese verliefen allerdings unerwartet negativ, weil Dexamethason alleine die Ausbildung des vollständigen, osteogenen Phänotyps nicht induzieren konnte. Dies ist deshalb besonders erstaunlich, da Dexamethason als Trigger der osteogenen Differenzierung in MSC-Kulturen fast universell verwendet wird. Auch in einem bedeutenden, wissenschaftlichen Grundlagenaufsatzz von

Pittenger et al. im Jahre 1999, welcher die Stammzelleigenschaften von MSC bestätigt, wird das Glukokortikoid als notwendiger Induktor der osteogenen Differenzierung beschrieben (Pittenger et al., 1999).

Dieser Artikel verwendet, ähnlich wie viele andere, den Nachweis der Induktion der Alkalischen Phosphatase und der Kalziumablagerung als Hauptindikator für eine beginnende Osteogenese. Auch wenn meine Ergebnisse bestätigen, dass Dexamethason die Expression der AP und die Ablagerung von Kalzium fördert, gelang es mit qPCR nicht, die Induktion der anderen Osteogenesemarker, insbesondere der Transkriptionsfaktoren RunX2 und Osterix und der Matrixproteine Osteopontin, Osteokalzin und Bone Sialoprotein, zu identifizieren. Nichtsdestotrotz bestätigen die qPCR-Versuche eine starke Induktion der AP, welche die Funktionalität der qPCR-Assaybedingungen bestätigt. Aufgrund dieser Widersprüche initiierte das *Center for Advanced Orthopaedic Studies* in Harvard eine weitere detailliertere Analyse dieses Problems. Dabei bestätigte Ferreira die hier vorgelegten Ergebnisse (Ferreira et al., 2013).

Diese unklare Datenlage ließ es nicht zu, einen klaren Effekt des cCM auf die osteogene Differenzierung der hBMSC zu bestimmen. Vermutlich existieren zusätzliche, bisher noch unbekannte Regulierungsmechanismen.

Im Besonderen besteht keine direkte Korrelation zwischen den Effekten des cCM-Zusatzes auf die Aktivität der AP und die Kalziumablagerung. Dies ist erstaunlich, weil allgemein anerkannt ist, dass Kalzium extrazellulär ausfällt, wenn die AP das Phosphat des im Medium präsenten β -Glycerophosphats abspaltet. Die wohl wahrscheinlichste Erklärung dieser Diskrepanz ist die Bildung und Ausschüttung von löslichen Faktoren durch die hBMSC, die eher die Chemie der Mineralisierung als die Differenzierung dieser Zellen beeinflusst.

Die Produktion dieser möglichen Faktoren ist stark von den Zellkulturbedingungen abhängig. Die Kalziumablagerung wurde durch das cCM von Kulturen mit geringerer Zellsaatdichte (1.000 und 5.000 Zellen/cm²) gehemmt. Merkwürdig ist, dass diese Hemmung bei cCM-Zusatz von Kulturen mit der höchsten Zellsaatdichte (10.000 Zellen/cm²) nicht sichtbar, sondern - im Gegenteil - die Mineralisierung deutlich erhöht war. Aus biologischer Sicht wäre dies jedoch kein Widerspruch, da so die lokale Zelldichte ein wirksamer Regulator der gerichteten Mineralisierung wäre und ungewollte Mineralisierung an unerwünschter Stelle alleine durch die Verringerung der Zelldichte verhindert werden könnte.

Gerade deshalb ist es notwendig die Mechanismen, die hinter diesen scheinbar widersprüchlichen Effekten stecken, zu untersuchen, insbesondere dann, wenn MSC klinisch für die Bildung von neuem Knochen verwendet werden sollen.

4.2 Die Identität der *stemness*-Faktoren der hBMSC

Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den *stemness*-Faktoren letztlich um Moleküle aus der Gruppe der Zytokine handelt.

In Zuge der hier beschriebenen Experimente konnten verschiedene mögliche Moleküle bereits ausgeschlossen werden. Durch die Methode der Aufreinigung des CM entfallen alle Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner als 10 kDa (siehe 2.1.3). Durch das Einfrieren des cCM und der Zellen werden damit auch solche Faktoren ausgeschlossen, die beim Einfrieren nicht stabil bleiben. Ausgeschieden sind dadurch beispielsweise Prostaglandine, Stickstoffmonoxid, Nukleotide und Metallionen.

Übrig bleiben somit Moleküle, die größer als 10 kDa sind und durch das Einfrieren nicht beeinträchtigt werden.

In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen in der Zellbiologie von Stammzellen kommen somit in erster Linie Moleküle aus der Gruppe der Zytokine als *stemness*-Faktoren der hBMSC in Betracht.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bilden hBMSC eine große Anzahl von verschiedenen Zytokinen (Tabelle 1). Es gibt allerdings nur wenige Studien, die die Beeinflussung der *stemness* durch Zytokine beschreiben.

Die erste Arbeit hierzu wurde von der Gruppe um Tuan am NIH durchgeführt. Mitglieder seiner Gruppe verwendeten Microarray-Analysen, um MSC-Transkriptome mit MSC-Populationen zu vergleichen, die zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzierten, mit denjenigen, die in der Folge zurück zu MSC de-differenzierten (Song et al., 2006). Dies brachte eine Anzahl an möglichen *stemness*-Genen hervor, von denen IL-6 später als führender Kandidat identifiziert wurde (Pricola et al., 2009).

Allerdings fand ein anderes Mitglied aus der Arbeitsgruppe in Boston heraus, dass IL-6 die Chondrogenese der hBMSC *steigert*, was dieses Zytokin als *stemness*-Faktor eliminiert (Porter, persönliche Kommunikation).

FGF-2 ist ebenfalls als *stemness*-Faktor von großem Interesse. Zaragozi et al., welche humane MSC aus Fettgewebe verwendeten, identifizierten FGF-2 als wichtigen autokrinen Faktor, der die Teilungsfähigkeit und das Differenzierungspotenzial der MSC aufrechterhält (Zaragozi et al., 2006). In diesen Studien blieb FGF-2 MSC-assoziiert.

Auf der anderen Seite berichteten Sanchez et al. darüber, dass die *stemness* von humanen ESC durch exogenes FGF-2 aus humanen MSC-Kulturen aus Fettgewebe aufrechterhalten werden kann. In dieser Studie wurde also das FGF-2 von MSC produziert, aber für die Bewahrung der *stemness* der ESC verwendet (Sanchez et al., 2012).

Crisostomo et al. berichteten, dass hBMSC selbst kein FGF-2 in Kultur ausschütten, sondern dies nur dann tun, wenn die hBMSC mit TNF- α , Lipopolysacchariden oder durch Hypoxie stimuliert wurden (Crisostomo et al., 2008). Interessanterweise wird FGF-2 oft zu Kulturen von humanen MSC hinzugefügt, um ihre Wachstumseigenschaften zu verbessern, speziell im Kontext der Chondrogenese (Hagmann et al., 2013). Unklar ist jedoch, ob dieses Wachstum durch FGF-2 qualitativ zu einem hohen chondrogenen Potenzial führt (Bianchi et al., 2003) oder nur die MSC zur Chondrogenese vorbereitet (Handorf et al., 2011).

In einem vor kurzem veröffentlichten Bericht von Eom et al. wurden FGF-2, IL-6 und eine Anzahl an weiteren Wachstumsfaktoren als mögliche autokrine *stemness*-Faktoren untersucht (Eom et al., 2014). Die *stemness* der hBMSC-Kulturen scheint mit steigender Anzahl von Zellpassagen abzufallen. Allerdings blieb während der Zellpassagen die Bildung von FGF-2, IL-6, IGF-2, TGF- β 1 und VEGF unverändert. Dies lässt vermuten, dass diese Faktoren nicht unbedingt für die *stemness* verantwortlich sind. Andererseits nahm parallel zum Verlust der *stemness* während der Zellpassagen die Expression von EGF, FGF-2 und HGF ab. Schließlich zeigte jedoch, dass nur das Hinzufügen von HGF, im Gegensatz zu den anderen zwei Faktoren, die *stemness* während der Zellpassagen nicht beeinträchtigte.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die drei Wachstumsfaktoren, nämlich IL-6, FGF-2 und HGF, als potentielle *stemness*-Kandidaten beschrieben sind. Allerdings ist die Literatur hierzu sehr widersprüchlich, sodass weitergehende Forschung notwendig ist, um die *stemness*-Faktoren eindeutig zu identifizieren.

4.3 Die Effekte des Dexamethasons

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Zugabe des Dexamethasons zu hMSC-Kulturen für die Dreilinien-Differenzierung der MSC obligat (siehe 1.4). Bis heute ist ungeklärt, warum dies so ist.

Die Subhypothese der vorliegenden Arbeit postuliert, dass Dexamethason die Produktion von möglichen *stemness*-Faktoren hemmt und dadurch die Differenzierung erst ermöglicht. Dies

widerspricht der bisherigen weitverbreiteten Annahme, dass der Zusatz Dexamethasons die Differenzierung direkt induziert.

Auch Haynesworth fand heraus, dass Dexamethason indirekt die Differenzierung induziert, indem es die Synthese von IL-6 hemmt (Haynesworth et al., 1996).

Zum Zeitpunkt der Experimente war es ein unerwartetes Resultat, dass Dexamethason unfähig ist, einen vollständig osteoblastischen Phänotyp zu induzieren, obwohl es ein potenter Induktor der AP und der Mineralisierung ist. Diese Ergebnisse wurden allerdings später im gleichen Labor durch Ferreira mit anderen Experimenten bestätigt und um weitere Erkenntnisse erweitert (Ferreira et al., 2013).

Insgesamt muss man festhalten, dass die Rolle Dexamethasons bisher nicht vollständig verstanden wurde. Folgeversuche sollten dieser Fragestellung nachgehen.

4.4 Klinische Relevanz

Unabhängig davon, ob MSC als Progenitorzellen von differenzierten, mesenchymalen Zellen im Tissue Engineering oder ob MSC als Quelle für trophische Faktoren zur Stimulierung endogener Regeneration verwendet werden, ist essentiell, dass die Zellen ihre *stemness* und somit ihre Fähigkeit, neues Gewebe zu generieren, bewahren.

Für die meisten, wenn nicht alle praktisch Anwendungen ist es notwendig, die MSC zu kultivieren, um eine ausreichende Anzahl an Zellen für klinische Zwecke zur Verfügung zu haben. Während des Proliferationsprozesses ist es essentiell, dass die MSC ihre fundamentalen multipotenten Eigenschaften behalten, um eine erfolgreiche klinische Anwendung zu ermöglichen.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Zusammenhänge leisten einen Beitrag zum Verständnis der Frage, wie MSC ihre *stemness* - Eigenschaft in Monolayerkulturen bewahren. Mit Hilfe der vorgelegten Befunde sollte es möglich sein, optimale Kulturbedingungen zu definieren, unter denen sich die MSC *in vitro* besser als bisher für eine spätere klinische Verwendung vermehren lassen.

4.5 Zukünftige Forschung

Die vorliegende Arbeit legt mehrere zukünftige Forschungsansätze nahe.

Die erste, zu vertiefende Analyse sollte darauf abzielen, den Faktor oder die Faktoren innerhalb der hBMSC zu identifizieren, der oder die für die *stemness* verantwortlich ist oder sind. Es sind mehrere Ansätze zur Identifizierung dieser Faktoren denkbar.

Eine Möglichkeit wäre der “Zytokin-Ansatz”. Bei diesem werden einzelne Zytokine vom cCM zum Beispiel durch Addition von Antikörpern neutralisiert, um die Hemmung der Differenzierung ohne den Einfluss dieses Zytokins zu untersuchen. Alternativ könnte die Synthese einzelner Zytokine durch siRNA von Spender-hBMSC-Kulturen verhindert werden. Der Vorteil dieses Ansatzes ist seine Einfachheit. Der Nachteil besteht darin, dass es schwierig wird, wenn mehr als ein Zytokin daran beteiligt ist, die *stemness* aufrechtzuerhalten, oder aber auch, wenn der *stemness*-Faktor nicht aus der Zytokingruppe stammt und damit neuartig wäre.

Ein zweiter Ansatz wäre der Versuch, die *stemness*-Faktoren des cCM durch traditionelle, biochemische Reinigungsmethoden zu isolieren. MSC können sich leicht vermehren, und ich habe gezeigt, dass der mögliche Faktor ziemlich stabil ist, sodass dieser Ansatz brauchbar erscheint. Wenn die *stemness* nämlich mehrere Faktoren benötigt, die miteinander in Beziehung stehen, wird dies durch einen plötzlichen Aktivitätsverlust bei einem Reinigungsschritt, welche die Faktoren trennt, signalisiert. Dies könnte dann die Voraussetzung dafür schaffen, die relevanten Komponenten zu identifizieren.

Ein zusätzlicher Ansatz könnte darin liegen, die Wirkungen von Dexamethason auf die Synthese von identifizierten *stemness*-Faktoren zu prüfen. Standardtechniken der Genexpression könnten die Stelle auf der DNA, an der Dexamethason regulär wirksam wird, bestimmen.

Ein weiterer methodischer Ansatz zukünftiger Forschung könnte sich an meinen Daten zur osteoblastischen Differenzierung orientieren. Die Daten legen nämlich nahe, dass der Bereich der *in vitro*-Differenzierung der hBMSC zu Osteoblasten überprüft wird, um ein System zu entwickeln, bei dem die MSC zu einem “richtigen” Osteoblasten heranwachsen. Eine solche Qualität bedeutet in diesem Falle, dass die Zellen nicht nur AP exprimieren und Kalzium ablagern, sondern auch einen vollständigen, osteoblastischen Phänotypen bilden.

Schließlich zeigen die hier präsentierten Daten, dass hBMSC unter geeigneten Kulturbedingungen sehr starke Inhibitoren der Kalziumablagerung ausschütten. Wenn diese Inhibitoren identifiziert und entsprechend manipuliert würden, könnten daraus Behandlungsstrategien für Krankheiten entwickelt werden, bei denen eine exzessive und ungewollte Kalziumablagerung vorkommt.

5 Zusammenfassung

Eine Möglichkeit für Zell- und Gentherapie ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus adultem Knochenmark. MSC sind aufgrund der Einfachheit ihrer Isolierung, ihrer Expansionsfähigkeit und ihres Multilinien-Differenzierungspotenzials attraktive Kandidaten zur therapeutischen Anwendung in TERM.

Seit mehr als 3 Jahrzehnten stehen MSC im Fokus des internationalen wissenschaftlichen Interesses. Jedoch sind sie, was viele ihrer Eigenschaften betrifft, bis heute unvollständig definiert und charakterisiert. Die spezifischen Mechanismen der MSC-*stemness* und -differenzierung sind bisher kaum verstanden.

Die vorliegende Arbeit untersucht den Effekt autokriner Faktoren, die von hMSC produziert und ausgeschüttet werden, auf Dexamethason-induzierte Dreilinien-Differenzierung.

Die Ergebnisse legen nahe und unterstützen die Hypothese, dass hMSC Faktoren ausschütten, die die multipotenten Zellen in ihrem undifferenzierten Status bewahren, d.h. jegliche Differenzierung inhibieren. Dies gilt generell für die Chondrogenese und Adipogenese unter jeder einzelnen Zellkulturbedingung in der hier präsentierten Studie.

Für die Osteogenese stellt sich das Bild jedoch differenzierter dar. Alle Kulturbedingungen waren stimulierend im Hinblick auf die Expression der AP. Außerdem lagerten die am dichtesten gesäten Zellkulturen signifikant mehr Kalzium ab. Dennoch hatte das cCM nur einen geringen Effekt auf die Menge an osteogenen mRNA-Transkripten. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die im cCM präsenten autokrinen Faktoren nicht direkt die Differenzierung, jedoch aber die Manifestation des primären Stammzellphänotyps beeinflussen.

Die Rolle des Glukokortikoids Dexamethason bei der Differenzierung von MSC bleibt unklar. Auch wenn Dexamethason oft in Kulturmedien verwendet wird und als Differenzierungsinduktor weltweit etabliert ist, kann es alleine nicht den vollständigen osteoblastischen Phänotyp induzieren.

Zusätzliche *in vitro*- und *in vivo*-Studien sind notwendig, um die autokrinen und parakrinen Faktoren, die für die schrittweise Entwicklung von einer unreifen Stammzelle bis zu einem

reifen Phänotyp wie Knochen, Knorpel, Fett zuständig sind, besser zu charakterisieren und zu identifizieren.

Eine sicherlich große Herausforderung ist dabei die Anfertigung eines Protokolls, das sicherstellt, dass sich MSC unter klinisch anwendbaren Kulturbedingungen zur Verwendung in neuen Zell- und Gentherapien effizient und kontrolliert vermehren und differenzieren.

6 Material

6.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarosegel	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Analysewaage	Denver Instrument Co., Denver, Co, USA
Analysewaage	Sartorius Corporation, Edgewood, NY, USA
Bildverarbeitungssystem (QCapture)	Qimaging, Surrey, BC, Canada
Brutschrank (Isotemp Plus; 37°C, 5% CO2)	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Dispenseraufsätze	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank -20°C	Sears Holdings Corporation, Hoffman Estates, IL, USA
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific
Handschuhe	Thermo Fisher Scientific
Heizblock	Thermolyne, Dubuque, IA, USA
Hochdrucksterilisator (Tuttnauer Brinkmann 3850 M Autoclave)	Tuttnauer USA Co. Ltd., Hauppauge, NY, USA
Horizontalschüttler	Thermo Fisher Scientific
Kryobehälter (NALGENE Cryo 1°C Freezing Container)	Thermo Fisher Scientific
Kühlschrank -4°C	Sears Holdings Corporation
Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific
Mikroplattenlesegerät (Multi-Mode, Synergy MX)	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
Mikroskop (LEICA DMI)	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
Mikroskop (Olympus IX71)	Olympus, Center Valley, PA, USA
Neubauer Zählkammer (HC)	Reichert, Depew, NY, USA
Nuklease-freie Röhrchen	Eppendorf North America, Hauppauge, NY, USA
Objektträger	Thermo Fisher Scientific
Paraffin	Thermo Fisher Scientific

PCR-Gerät (Stratagene Mx3000P QPCR System)	SABiosciencesTM, Qiagen, Valencia, CA, USA
Photoapparat (Olympus TH4-100)	Olympus
Pipetten (1ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Pipettenspitzen (0,1-2,5 µl; 0-10 µl; 0-20 µl; 20-200 µl; 200-1000 µl)	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen (sterile Fisherbrand low retention 1000 µl)	Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfe	Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfe (elektrisch)	Thermo Fisher Scientific
Reamer Irrigator Aspirator (RIA)	Synthesis, Paoli, PA, USA
Spektrophotometer (Nanodrop 1000)	Thermo Fisher Scientific
Sterile Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific
Stickstofftank	Thermo Fisher Scientific
Thermozykler (Biometra T3000)	LABREPCO, Horsham, PA, USA
Vortexer	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	BD Biosciences
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-well; klar, weiß, schwarz opaq)	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturplatten (96-well, Polypropylen)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zentrifugale Filter (Centricon® Plus-70 Protein Columns)	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Zentrifuge (Sorvall Legend Micro 21 R)	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge (Sorvall Legend RT+)	Thermo Fisher Scientific
Zentrifugentuben (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences

6.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

AbAm	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Alizarinrot-Lösung	Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure (L-Ascorbinsäure-2-Phosphat)	Sigma-Aldrich

Borinsäure (pH 4,0)	Sigma-Aldrich
Chondroitinsulfat (Spezies: Haifischflossenknorpel)	Sigma
Cytoseal™ XYL mounting medium	Thermo Fisher Scientific
Dexamethason	Sigma-Aldrich
DMEM Zellkulturmedium mit 1 mM Pyruvat - <i>low glucose</i> (1g/l) - <i>high glucose</i> (4,5g/l)	Mediatech Inc., Manassas, VA, USA (heutzutage zugehörig zu Thermo Fisher Scientific)
DMMB	Sigma-Aldrich
Ethanol	Thermo Fisher Scientific
FBS	Hyclone (Thermo Scientific), Logan, Utah, USA
Gefriermedium (Recovery™ Freezing Medium mit 10% DMSO)	Life Technologies, Grand Island, NY, USA
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich
HCl	Thermo Fisher Scientific
IBMX	Sigma-Aldrich
Indomethazin	Sigma-Aldrich
Insulin (aus Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich
NaOH	Thermo Fisher Scientific
Oil Red O-Lösung	Sigma-Aldrich
Papain (von Papaya Latex)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS (ohne Kalzium und Magnesium) - 8g NaCl - 0,2g KCl - 1,15g Na ₂ HPO ₄ - 0,2g KH ₂ PO ₄ - 1l dH ₂ O	Mediatech Inc. (heutzutage zugehörig zu Thermo Fisher Scientific)
PNP Standardlösung	Sigma-Aldrich
PNPP Puder	Sigma-Aldrich
Prolin	Sigma-Aldrich

SYBR Green PCR Master Mix (2X)	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
TNE Puffer (10X, pH 7,4) - 100 mM Tris - 10 mM EDTA - 2 M NaCl	Vorbereitet im Labor
Toluidinblau (pH 3,0)	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin, 1 mM EDTA)	
Xylol	VWR International, West Chester, PA, USA
1% ITS + Premix (BD ITS Premix) humane rekombinante Insulin 12,5mg humane natürliche Transferrin 12,5mg Selensäure 12,5mg Linolsäure 10,7mg Bovines Serumalbumin (BSA) 2,5g	BD Biosciences

6.3 Fertigkombinationen von Biochemikalien

QuantiChrom™ Calcium Assay Kit	BioAssay Systems, Hayward, CA, USA
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Invitrogen
SV Total RNA Isolation System	Promega Corporation, Madison, WI, USA
GoScript™ Reverse Transcription System	Promega Corporation

6.4 Rekombinante Faktoren

TGF-β1	Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA
--------	---------------------------------

6.5 Primer

Primer (siehe Tabelle 3)	Life Technologies
Random primer	Promega

6.6 Zelllinien

hBMSC	Patientenmaterial (siehe Tabelle 1)
-------	-------------------------------------

6.7 Medien

Standardmedium	DMEM - <i>low glucose</i> + 10% FBS + 1% AbAm
Osteogenes Kulturmedium	Standardmedium + 10 mM β -Glycerolphosphat + 50 μ g/ml Ascorbinsäure +/- 10^{-7} M Dexamethason
Chondrogenes Kulturmedium	DMEM - <i>high glucose</i> + 1% ITS + 1% AbAm + 40 μ g/ml Prolin + 50 μ g/ml Ascorbinsäure +/- 10^{-7} M Dexamethason +/- TGF- β 1
Adipogenes Kulturmedium	Standardmedium + 5 μ g/ml Insulin + 0,5 mM IBMX + 60 μ M Indomethazin +/- 10^{-7} M Dexamethason

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen

Abbildung 1: Die prinzipielle Idee des Tissue Engineering (modifiziert nach www.nature.com). Zellen werden aus dem Körper extrahiert, in Kultur angereichert, auf Zellträger angesät, der entsprechenden chemischen, physikalischen und biologischen Umgebung ausgesetzt und dem Patienten wieder reimplantiert.

Abbildung 2: Stammzellbildung und -differenzierung (modifiziert nach www.bio-rad.com)

Abbildung 3: MSC Selbsterneuerung, Proliferation und Differenzierung (modifiziert nach Caplan et al., 2001). Multilinien-Differenzierung der MSC zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten erfordert u.a. Dexamethason.

Abbildung 4: Hypothese der hier vorliegenden Studie: MSC produzieren und schütten lösliche Faktoren aus, die die Zellen in ihrem undifferenzierten Status bewahren. Subhypothese: Dexamethason hemmt diese Differenzierungsinhibitoren und ermöglicht dadurch die Differenzierung der MSC.

Abbildung 5: Methode zur Produktion eines konzentrierten, konditionierten Mediums (cCM). (upc) bedeutet, die Zellen durften bis zu einer Konfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Abbildung 6: Experimentelles Design, um den Effekt unverarbeiteten CMs auf Dexamethason-induzierte Osteoblastendifferenzierung der hBMSC zu testen

Abbildung 7: (A) Der Effekt des CM auf den DNA-Gehalt der hBMSC-Monolayerkulturen unter osteoblastischen Kulturbedingungen. (B) Der Effekt des CM auf Dexamethason-induzierte Aktivität der AP der hBMSC. (C) Der Effekt des CM auf Dexamethason-induzierte *in vitro* Mineralisierung der hBMSC.

Abbildung 8: Experimentelles Design, um den Effekt konzentrierten CMs (cCM) auf das Zellüberleben der hBMSC unter osteoblastischen Kulturbedingungen zu testen

Abbildung 9: Der Effekt des cCM auf den DNA-Gehalt der hBMSC-Monolayerkulturen unter osteoblastischen Kulturbedingungen

Abbildung 10: Experimentelles Design zur osteogenen Differenzierung der hBMSC. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Abbildung 11: Der Effekt des cCM auf Dexamethason-induzierte AP-Aktivität der hBMSC. Die Graphen repräsentieren für jede einzelne cCM-Verdünnung die x-fache Induktion der AP in Dexamethason-behandelten Zellen mit cCM im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen in Abwesenheit von Dexamethason. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Abbildung 12: Der Effekt des cCM auf Dexamethason-induzierte *in vitro* Mineralisierung der hBMSC. Die Graphen repräsentieren für jede einzelne cCM-Verdünnung die x-fache Induktion der AP in Dexamethason-behandelten Zellen mit cCM im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen in Abwesenheit von Dexamethason. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Abbildung 13: Der Effekt des cCM aus dicht gesäten Kulturen ($10.000 \text{ Zellen/cm}^2$) auf Dexamethason-induzierte Knochenmarkgenexpression der hbMSC an Tag 10 (obere Reihe) und Tag 21 (untere Reihe), verglichen zu den entsprechenden Kontrollen ohne Dexamethazonzugabe.

Abbildung 14: Experimentelles Design zur chondrogenen Differenzierung der hBMSC. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Abbildung 15: Der Effekt des cCM auf den DNA-Gehalt der hBMSC-Pellets unter chondrogenen Kulturbedingungen. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Abbildung 16: GAG-Konzentration der hBMSC-Pellets, normalisiert zum DNA-Gehalt, in An- oder Abwesenheit von Dexamethason und TGF- β 1. Die untere Reihe zeigt die entsprechenden Toluidinblau-gefärbten Schnittpräparate.

Abbildung 17: Der Effekt des cCM auf Dexamethason- und TGF- β 1-induzierte Chondrogenese der hBMSC. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Abbildung 18: Experimentelles Design zur adipogenen Differenzierung der hBMSC. (upc) heißt, die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren.

Abbildung 19: Der Effekt des cCM auf Dexamethason-induzierte Adipogenese der hBMSC, mittels Oil Red O-Färbung dargestellt

7.2 Tabellen

Tabelle 1: Wachstumsfaktoren und Zytokine, die von hMSC potentiell ausgeschüttet werden

Tabelle 2: Patienteninformation

Tabelle 3: Liste und Sequenzen der Primer, die für die Analyse der mRNA-Expression verwendet wurden. Alle Sequenzen gelten für humane Gene. Primer vorwärts (F). Primer rückwärts (R). (Ferreira et al., 2013)

8 Abkürzungsverzeichnis

AbAm	Antibiotika + Antimykotika
AGPT-1	Angiopoetin-1
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
cCM	Konzentriertes, konditioniertes Zellkulturmedium
cDNA	Komplementär-DNA
CM	Konditioniertes Zellkulturmedium
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DMMB	Dimethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure Dinatriumsalzdihydrat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ESC	Embryonale Stammzelle
FBS	Fetales Rinderserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
Flt3l	FMS-like Tyrosinkinase-3-Ligand
GAG	Glykosaminoglykan
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GVHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
hBMSC	Mesenchymale Stammzellen aus humanem Knochenmark
HC	Hämatozytometer (Neubauer Zählkammer)
HCl	Hydrogenchlorid
HGF	Leberwachstumsfaktor
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IGF-1	Insulinähnlicher-Wachstumsfaktor-1

IL	Interleukin
iPS	Induzierte, pluripotente Stammzellen
IRB	<i>Institutional Review Board</i> (Ethikkomission)
KDa	Kilo Dalton
LIF	Leukämie-Hemmfaktor
mRNA	Messenger-RNA
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MIF	Makrophagen-Hemmfaktor
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MW	Molekulargewicht
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
NGF	Nervaler Wachstumsfaktor
NIH	<i>National Institute of Health</i>
OA	Osteoarthrose
OI	<i>Osteogenesis imperfecta</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNP	P-Nitrophenol
PNPP	P-Nitrophenolphosphat
RIA	<i>Reamer-Irrigator-Aspirator</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RunX2	Runt-related Transkriptionsfaktor 2
SCF	Stammzellfaktor
siRNA	<i>small interfering</i> -RNA
TERM	Tissue Engineering und Regenerative Medizin
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
(upc)	<i>unpassaged cells</i> (Die Zellen durften bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 90% ohne Zellpassage proliferieren)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

9 Referenzen

- Aubin, J. E. (1999). "Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation." *J Cell Biochem* **72**(3): 396-410.
- Baddoo, M., K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C. Hughes, G. C. Kopen and D. G. Phinney (2003). "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection." *J Cell Biochem* **89**(6): 1235-1249.
- Baksh, D., L. Song and R. S. Tuan (2004). "Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy." *J Cell Mol Med* **8**(3): 301-316.
- Bianchi, G., A. Banfi, M. Mastrogiacomo, R. Notaro, L. Luzzatto, R. Cancedda and R. Quarto (2003). "Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2." *Exp Cell Res* **287**(1): 98-105.
- Bosch, P., D. S. Musgrave, J. Y. Lee, J. Cummins, T. Shuler, T. C. Ghivizzani, T. Evans, T. D. Robbins and Huard (2000). "Osteoprogenitor cells within skeletal muscle." *J Orthop Res* **18**(6): 933-944.
- Bueno, E. M. and J. Glowacki (2009). "Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration." *Nat Rev Rheumatol* **5**(12): 685-697.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." *J Orthop Res* **9**(5): 641-650.
- Caplan, A. I. and J. E. Dennis (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." *J Cell Biochem* **98**(5): 1076-1084.
- Centeno, C. J., J. R. Schultz, M. Cheever, B. Robinson, M. Freeman and W. Marasco (2010). "Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique." *Curr Stem Cell Res Ther* **5**(1): 81-93.
- Cheng, L., H. Hammond, Z. Ye, X. Zhan and G. Dravid (2003). "Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture." *Stem Cells* **21**(2): 131-142.
- Cheng, S.-L. and L. V. Avioli (1996). "Expression of Bone Matrix Proteins during Dexamethasone-Induced Mineralization of Human Bone Marrow Stromal Cells." *Jounal of Cellular Biochemistry* **61**: 182-193.
- Colter, D. C., R. Class, C. M. DiGirolamo and D. J. Prockop (2000). "Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3213-3218.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, P. Tylzanowski and F. P. Luyten (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." *Arthritis Rheum* **44**(8): 1928-1942.
- Digirolamo, C. M., D. Stokes, D. Colter, D. G. Phinney, R. Class and D. J. Prockop (1999). "Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming

assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate." *Br J Haematol* **107**(2): 275-281.

Dimitriou, R., E. Jones, D. McGonagle and P. V. Giannoudis (2011). "Bone regeneration: current concepts and future directions." *BMC Med* **9**: 66.

Djouad, F., C. Bouffi, S. Ghannam, D. Noel and C. Jorgensen (2009). "Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases." *Nat Rev Rheumatol* **5**(7): 392-399.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* **8**(4): 315-317.

Doorn, J., G. Moll, K. Le Blanc, C. van Blitterswijk and J. de Boer (2012). "Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements." *Tissue Eng Part B Rev* **18**(2): 101-115.

Drago, D., C. Cossetti, N. Iraci, E. Gaude, G. Musco, A. Bachi and S. Pluchino (2013). "The stem cell secretome and its role in brain repair." *Biochimie* **95**(12): 2271-2285.

Evans, C. (2011). "Gene therapy for the regeneration of bone." *Injury* **42**(6): 599-604.

Evans, C. H. (2012). "Gene delivery to bone." *Adv Drug Deliv Rev* **64**(12): 1331-1340.

Evans, C. H. and P. D. Robbins (1995). "Possible orthopaedic applications of gene therapy." *J Bone Joint Surg Am* **77**(7): 1103-1114.

Evans, C. H. and M. Vrahas (2009). "Use of genetically modified muscle and fat grafts to repair defects in bone and cartilage." *European Cells and Materials* **18**: 96-111.

Ferreira, E., R. M. Porter, N. Wehling, R. P. O'Sullivan, F. Liu, A. Boskey, D. M. Estok, M. B. Harris, M. S. Vrahas, C. H. Evans and J. W. Wells (2013). "Inflammatory cytokines induce a unique mineralizing phenotype in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow." *J Biol Chem* **288**(41): 29494-29505.

Friedenstein, A. J. (1976). "Precursor cells of mechanocytes." *Int Rev Cytol* **47**: 327-359.

Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova and G. P. Frolova (1968). "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues." *Transplantation* **6**(2): 230-247.

Gardner, O. F., C. W. Archer, M. Alini and M. J. Stoddart (2013). "Chondrogenesis of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering." *Histol Histopathol* **28**(1): 23-42.

Gimble, J. and F. Guilak (2003). "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential." *Cytotherapy* **5**(5): 362-369.

Giordano, A., U. Galderisi and I. R. Marino (2007). "From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells." *J Cell Physiol* **211**(1): 27-35.

Gnecchi, M., Z. Zhang, A. Ni and V. J. Dzau (2008). "Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy." *Circ Res* **103**(11): 1204-1219.

Gregory, C. A., W. G. Gunn, A. Peister and D. J. Prockop (2004). "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction." *Anal Biochem* **329**(1): 77-84.

Gregory, C. A., J. Ylostalo and D. J. Prockop (2005). "Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate." *Sci STKE* **2005**(294): pe37.

Guzmán-Morales, J., H. El-Gabalawy, M. H. Pham, N. Tran-Khanh, M. D. McKee, W. Wu, M. Centola and C. D. Hoemann (2009). "Effect of chitosan particles and dexamethasone on human bone marrow stromal cell osteogenesis and angiogenic factor secretion☆." *Bone* **45**(4): 617-626.

Hagmann, S., B. Moradi, S. Frank, T. Dreher, P. W. Kammerer, W. Richter and T. Gotterbarm (2013). "FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential." *Cell Prolif* **46**(4): 396-407.

Hamidouche, Z., O. Fromigué, U. Nuber, P. Vaudin, J.-C. Pages, R. Ebert, F. Jakob, H. Miraoui and P. J. Marie (2010). "Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells." *Journal of Cellular Physiology* **224**(2): 509-515.

Hanada, K., L. A. Solchaga, A. I. Caplan, T. M. Hering, V. M. Goldberg, J. U. Yoo and B. Johnstone (2001). "BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis." *J Cell Biochem* **81**(2): 284-294.

Handorf, A. M. and W. J. Li (2011). "Fibroblast growth factor-2 primes human mesenchymal stem cells for enhanced chondrogenesis." *PLoS One* **6**(7): e22887.

Harrison, R. H., J. P. St-Pierre and M. M. Stevens (2014). "Tissue engineering and regenerative medicine: a year in review." *Tissue Eng Part B Rev* **20**(1): 1-16.

Haynesworth, S. E., M. A. Baber and A. I. Caplan (1992). "Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies." *Bone* **13**(1): 69-80.

Haynesworth, S. E. and A. I. Caplan (1996). "Cytokine Expression by Human Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells in vitro: Effects of Dexamethasone and IL-1α." *Journal of Cellular Physiology* **166**: 585-592.

Herberts, C. A., M. S. Kwa and H. P. Hermsen (2011). "Risk factors in the development of stem cell therapy." *J Transl Med* **9**: 29.

Hocking, A. M. and N. S. Gibran (2010). "Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair." *Exp Cell Res* **316**(14): 2213-2219.

Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8932-8937.

Hsu, S. L., R. Liang and S. L. Woo (2010). "Functional tissue engineering of ligament healing." *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* **2**: 12.

Huey, D. J., J. C. Hu and K. A. Athanasiou (2012). "Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive." *Science* **338**(6109): 917-921.

Illich, D. J., N. Demir, M. Stojkovic, M. Scheer, D. Rothamel, J. Neugebauer, J. Hescheler and J. E. Zoller (2011). "Concise review: induced pluripotent stem cells and lineage reprogramming: prospects for bone regeneration." *Stem Cells* **29**(4): 555-563.

Jaiswal, N., S. E. Haynesworth, A. I. Caplan and S. P. Bruder (1997). "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." *J Cell Biochem* **64**(2): 295-312.

Johnstone, B., T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg and J. U. Yoo (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." *Exp Cell Res* **238**(1): 265-272.

Jorgensen, C., F. Djouad, F. Apparailly and D. Noel (2003). "Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy." *Gene Ther* **10**(10): 928-931.

Jukes, J. M., C. A. van Blitterswijk and J. de Boer (2010). "Skeletal tissue engineering using embryonic stem cells." *J Tissue Eng Regen Med* **4**(3): 165-180.

Kim, C.-H. and G. S. Kim (1999). "Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss." *Journal of Endocrinology* **162**: 371-379.

Kim, K., D. Dean, A. G. Mikos and J. P. Fisher (2009). "Effect of initial cell seeding density on early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells cultured on cross-linked poly(propylene fumarate) disks." *Biomacromolecules* **10**(7): 1810-1817.

Kuhn, N. Z. and R. S. Tuan (2010). "Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis." *Journal of Cellular Physiology* **222**(2): 268-277.

Kuo, C. K., J. E. Marturano and R. S. Tuan (2010). "Novel strategies in tendon and ligament tissue engineering: Advanced biomaterials and regeneration motifs." *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* **2**: 20.

Lazarus, H. M., S. E. Haynesworth, S. L. Gerson, N. S. Rosenthal and A. I. Caplan (1995). "Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use." *Bone Marrow Transplant* **16**(4): 557-564.

Le Blanc, K., F. Frassoni, L. Ball, F. Locatelli, H. Roelofs, I. Lewis, E. Lanino, B. Sundberg, M. E. Bernardo, M. Remberger, G. Dini, R. M. Egeler, A. Bacigalupo, W. Fibbe, O. Ringden, B. Developmental Committee of the European Group for and T. Marrow (2008). "Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study." *Lancet* **371**(9624): 1579-1586.

Le Blanc, K. and M. Pittenger (2005). "Mesenchymal stem cells: progress toward promise." *Cytotherapy* **7**(1): 36-45.

Le Blanc, K., I. Rasmussen, B. Sundberg, C. Gothenstrom, M. Hassan, M. Uzunel and O. Ringden (2004). "Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploididentical mesenchymal stem cells." *Lancet* **363**(9419): 1439-1441.

Lieberman, J. R., A. Daluiski, S. Stevenson, L. Wu, P. McAllister, Y. P. Lee, J. M. Kabo, G. A. Finerman, A. J. Berk and O. N. Witte (1999). "The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats." *J Bone Joint Surg Am* **81**(7): 905-917.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.

Loeffler, M. and I. Roeder (2002). "Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach." *Cells Tissues Organs* **171**(1): 8-26.

Lui, P. P., Y. F. Rui, M. Ni and K. M. Chan (2011). "Tenogenic differentiation of stem cells for tendon repair--what is the current evidence?" *J Tissue Eng Regen Med* **5**(8): e144-163.

Mackay, A. M., S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester and M. F. Pittenger (1998). "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow." *Tissue Eng* **4**(4): 415-428.

Majumdar, M. K., M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman and S. L. Gerson (1998). "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells." *J Cell Physiol* **176**(1): 57-66.

Malgieri, A., E. Kantzari, M. P. Patrizi and S. Gambardella (2010). "Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art." *Int J Clin Exp Med* **3**(4): 248-269.

Marino, R., C. Martinez, K. Boyd, M. Dominici, T. J. Hofmann and E. M. Horwitz (2008). "Transplantable marrow osteoprogenitors engraft in discrete saturable sites in the marrow microenvironment." *Exp Hematol* **36**(3): 360-368.

Mason, C. and P. Dunnill (2008). "A brief definition of regenerative medicine." *Regen Med* **3**(1): 1-5.

Miller, M. A., A. Ivkovic, R. Porter, M. B. Harris, D. M. Estok, 2nd, R. M. Smith, C. H. Evans and M. S. Vrahas (2011). "Autologous bone grafting on steroids: preliminary clinical results. A novel treatment for nonunions and segmental bone defects." *Int Orthop* **35**(4): 599-605.

Neuhuber, B., S. A. Swanger, L. Howard, A. Mackay and I. Fischer (2008). "Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics." *Exp Hematol* **36**(9): 1176-1185.

Noth, U., A. M. Osyczka, R. Tuli, N. J. Hickok, K. G. Danielson and R. S. Tuan (2002). "Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells." *J Orthop Res* **20**(5): 1060-1069.

Noth, U., L. Rackwitz, A. F. Steinert and R. S. Tuan (2010). "Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration." *Adv Drug Deliv Rev* **62**(7-8): 765-783.

Noth, U., A. F. Steinert and R. S. Tuan (2008). "Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy." *Nat Clin Pract Rheumatol* **4**(7): 371-380.

Park, K. S., Y. S. Kim, J. H. Kim, B. Choi, S. H. Kim, A. H. Tan, M. S. Lee, M. K. Lee, C. H. Kwon, J. W. Joh, S. J. Kim and K. W. Kim (2010). "Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation." *Transplantation* **89**(5): 509-517.

Penick, K. J., L. A. Solchaga and J. F. Welter (2005). "High-throughput aggregate culture system to assess the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells." *Biotechniques* **39**(5): 687-691.

Phinney, D. G. and D. J. Prockop (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views." *Stem Cells* **25**(11): 2896-2902.

Pittenger, M. F. (2008). "Mesenchymal stem cells from adult bone marrow." *Methods Mol Biol* **449**: 27-44.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-147.

Pittenger, M. F. and B. J. Martin (2004). "Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics." *Circ Res* **95**(1): 9-20.

Porter, R. M., F. Liu, C. Pilapil, O. B. Betz, M. S. Vrahas, M. B. Harris and C. H. Evans (2009). "Osteogenic potential of reamer irrigator aspirator (RIA) aspirate collected from patients undergoing hip arthroplasty." *Journal of Orthopaedic Research* **27**(1): 42-49.

Pricola, K. L., N. Z. Kuhn, H. Haleem-Smith, Y. Song and R. S. Tuan (2009). "Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism." *Journal of Cellular Biochemistry* **108**(3): 577-588.

Reese, J. S., O. N. Koc and S. L. Gerson (1999). "Human mesenchymal stem cells provide stromal support for efficient CD34+ transduction." *J Hematother Stem Cell Res* **8**(5): 515-523.

Reger, R. L., A. H. Tucker and M. R. Wolfe (2008). "Differentiation and characterization of human MSCs." *Methods Mol Biol* **449**: 93-107.

Roobrouck, V. D., K. Vanuytsel and C. M. Verfaillie (2011). "Concise review: culture mediated changes in fate and/or potency of stem cells." *Stem Cells* **29**(4): 583-589.

Ryan, J. M., F. Barry, J. M. Murphy and B. P. Mahon (2007). "Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells." *Clin Exp Immunol* **149**(2): 353-363.

Sanchez, L., I. Gutierrez-Aranda, G. Ligero, M. Martin, V. Ayllon, P. J. Real, V. Ramos-Mejia, C. Bueno and P. Menendez (2012). "Maintenance of human embryonic stem cells in media conditioned by human mesenchymal stem cells obviates the requirement of exogenous basic fibroblast growth factor supplementation." *Tissue Eng Part C Methods* **18**(5): 387-396.

Sekiya, I., B. L. Larson, J. R. Smith, R. Pochampally, J. G. Cui and D. J. Prockop (2002). "Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality." *Stem Cells* **20**(6): 530-541.

Shake, J. G., P. J. Gruber, W. A. Baumgartner, G. Senechal, J. Meyers, J. M. Redmond, M. F. Pittenger and B. J. Martin (2002). "Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects." *Ann Thorac Surg* **73**(6): 1919-1925; discussion 1926.

Sharma, R. R., K. Pollock, A. Hubel and D. McKenna (2014). "Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices." *Transfusion* **54**(5): 1418-1437.

Sheridan, C. (2013). "Cardiac stem cell therapies inch toward clinical litmus test." *Nat Biotechnol* **31**(1): 5-6.

Siegel, G., T. Kluba, U. Hermanutz-Klein, K. Bieback, H. Northoff and R. Schafer (2013). "Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells." *BMC Med* **11**: 146.

Song, L., N. E. Webb, Y. Song and R. S. Tuan (2006). "Identification and Functional Analysis of Candidate Genes Regulating Mesenchymal Stem Cell Self-Renewal and Multipotency." *Stem Cells* **24**(7): 1707-1718.

Steinert, A. F., L. Rackwitz, F. Gilbert, U. Noth and R. S. Tuan (2012). "Concise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives." *Stem Cells Transl Med* **1**(3): 237-247.

Tolar, J., K. Le Blanc, A. Keating and B. R. Blazar (2010). "Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells." *Stem Cells* **28**(8): 1446-1455.

Trounson, A., R. G. Thakar, G. Lomax and D. Gibbons (2011). "Clinical trials for stem cell therapies." *BMC Med* **9**: 52.

Wang, Y., M. Yuan, Q. Y. Guo, S. B. Lu and J. Peng (2014). "Mesenchymal stem cells for treating articular cartilage defects and osteoarthritis." *Cell Transplant*.

Wehling, N., G. D. Palmer, C. Pilapil, F. Liu, J. W. Wells, P. E. Müller, C. H. Evans and R. M. Porter (2009). "Interleukin-1 β and tumor necrosis factor α inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF- κ B-dependent pathways." *Arthritis & Rheumatism* **60**(3): 801-812.

Wei, H., G. Shen, X. Deng, D. Lou, B. Sun, H. Wu, L. Long, T. Ding and J. Zhao (2013). "The role of IL-6 in bone marrow (BM)-derived mesenchymal stem cells (MSCs) proliferation and chondrogenesis." *Cell Tissue Bank* **14**(4): 699-706.

Whyte, J. L., S. G. Ball, C. A. Shuttleworth, K. Brennan and C. M. Kiely (2011). "Density of human bone marrow stromal cells regulates commitment to vascular lineages." *Stem Cell Res* **6**(3): 238-250.

Wu, S. M. and K. Hochedlinger (2011). "Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine." *Nat Cell Biol* **13**(5): 497-505.

Yoo, J. U., T. S. Barthel, K. Nishimura, L. Solchaga, A. I. Caplan, V. M. Goldberg and B. Johnstone (1998). "The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells." *J Bone Joint Surg Am* **80**(12): 1745-1757.

Young, H. E., T. A. Steele, R. A. Bray, J. Hudson, J. A. Floyd, K. Hawkins, K. Thomas, T. Austin, C. Edwards, J. Cuzzourt, M. Duenzl, P. A. Lucas and A. C. Black, Jr. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." *Anat Rec* **264**(1): 51-62.

Zaragozi, L.-E., G. Ailhaud and C. Dani (2006). "Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Is Critical for Self-Renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells." *Stem Cells* **24**(11): 2412-2419.

Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz and M. H. Hedrick (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies." *Tissue Eng* **7**(2): 211-228.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Chris Evans und Elisabeth Ferreira für die Ermöglichung dieses Projektes. Ihr Wissen, ihre Begeisterung für das Thema und ihre Geduld haben in einem ganz erheblichen Maß zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Elisabeth, merci pour les six mois dans et en dehors du laboratoire, ta patience tout au long des jours. Chris, thank you for your indefatigable support!

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team des „Center for Advanced Orthopaedic Studies“ am Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA. Sie alle waren mir eine große Unterstützung in der Versuchsdurchführung, der Datenanalyse sowie bei Fragen im Laboralltag.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich für die hervorragende und immer zuverlässige Betreuung bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Stefan Milz, bedanken. Ohne ihn wäre der erfolgreiche Abschluss dieses Projektes nicht möglich geworden.

Anna Speroni, Leonardo Rozenthal und Satya Chandrashekhar danke ich für die immer passende Ablenkung in Boston und Alexander Poszler für sein stets offenes Ohr in dieser Zeit.

Ein großer Dank gilt auch meinen Mädels in München, die mir immer mit Tat und Rat zur Seite standen und das Studium zur besten Zeit überhaupt gemacht haben.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester. Ohne ihre ausdauernde und vielseitige Unterstützung wäre die Umsetzung meiner Promotion und meines Studiums nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Versicherung

Wehling, Carola

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
**Die Ausschüttung autokriner und parakriner stemness-Faktoren durch humane
mesenchymale Stammzellen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzelne nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand