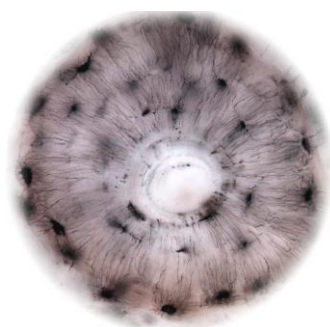


---

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

**Auswirkung von Hypoxie und HIF-1 $\alpha$  Regulation auf Proliferations-  
und Differenzierungsverhalten von hMSCs**



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

vorgelegt von

Josef Michael März  
aus München

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Susanne Mayer  
Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires  
Prof. Dr. med. Ralf Sodian

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Elias Volkmer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2016

τῆς δ' ἀρετῆς ἰδρῶτα θεοὶ προπάραιθεν ἔθηκαν ἀθάνατοι ·  
μακρὸς δὲ καὶ ὄρθιος οἶμος ἐς αὐτήν ...

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1. Struktur und Funktion von Knochengewebe.....	7
1.2. Frakturheilung .....	9
1.2.1. Primäre Frakturheilung .....	9
1.2.2. Sekundäre Frakturheilung.....	10
1.3. Klinische Problematik:.....	12
1.3.1. Ausbleibende Frakturheilung aufgrund Pseudoarthrosenbildung.....	12
1.3.2. Knochendefekte .....	13
1.3.3. Therapieoptionen .....	14
1.3.3.1. Autologe Knochen transplantation .....	14
1.3.3.2. Regenerative Therapiestrategien: <i>Tissue Engineering</i> (TE) von Knochengewebe .....	15
1.3.4. Stammzellen .....	18
1.3.4.1. Embryonale Stammzellen (ES).....	18
1.3.4.2. Humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC) .....	18
1.3.4.3. Immortalisierte hMSC (SCP-1) .....	21
1.3.5. Hypoxie in <i>Tissue Engineering</i> und Regenerativer Medizin .....	21
1.3.6. HIF-1 $\alpha$ .....	22
1.3.7. Die Rolle von Hypoxie und HIF-1 $\alpha$ während der osteogenen Differenzierung.....	24
1.4. Aufgabenstellung .....	25
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>27</b>
2.1. Zellkultur und verwendete Zellen .....	27
2.2. <i>In vitro</i> Kulturbedingungen .....	28
2.3. Besiedelung, Passagierung und Konservierung der Zellen.....	28
2.4. Wachstumskinetik .....	30
2.5. Osteogene Differenzierung .....	30
2.6. Molekularbiologie .....	32
2.6.1. mRNA-Isolierung.....	32
2.6.2. cDNA-Synthese .....	32
2.6.3. Semiquantitative PCR-Analyse .....	32
2.6.4. mRNA-Expressionsmusteranalyse .....	33

2.6.5. siRNA-Knock-Down auf mRNA und Proteinebene.....	34
2.6.6. Desferrioxamin (DFO) Stabilisierungsversuch: HIF-1 $\alpha$ bei Normoxie .....	36
2.6.7. Wiederholter siRNA-Knock-Down und DFO Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ während der osteogenen Differenzierung .....	37
2.6.8. Western Blot .....	39
2.6.8.1. Rapid Protein Extraktion .....	39
2.6.8.2. HIF-1 $\alpha$ -Western Blot.....	39
2.6.9. Zellfraktionierung .....	40
2.7. Mikroskopie .....	41
2.7.1. Alizarin Rot Färbung .....	41
2.7.2. Pimonidazolfärbung .....	42
2.8. Fluorimetrische Sauerstoffmessung.....	42
2.8.1. Sauerstoffmessung unter Hypoxie- und Normoxiebedingungen .....	43
2.8.2. Sauerstoffmessung im Anaerojar.....	45
2.9. Auswertmethoden .....	46
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1. Bestimmung der Sauerstoffverhältnisse im Kulturmedium.....	47
3.1.1. Verlauf der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium unter Normoxie-, Hypoxie-, und Anoxiebedingungen .....	47
3.2. Proliferationskinetik .....	49
3.2.1. Proliferationskinetik unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen.....	49
3.2.2. Proliferationskinetik unter Anoxiebedingungen .....	52
3.2.3. Proliferationskinetik von SCP-1 in 12-well-Kulturschalen.....	53
3.3. Expression von HIF-1 $\alpha$ auf mRNA-Ebene.....	55
3.4. Nachweis zellulärer Hypoxie .....	57
3.5. Verfolgbarkeit und Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Knock-Downs auf mRNA- Ebene.....	59
3.6. Verfolgbarkeit und Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Knock-Downs auf Proteinebene.....	61
3.7. siRNA-Knock-Down von HIF-1 $\alpha$ bewirkt Downregulation von VEGF auf mRNA Ebene.....	63
3.8. HIF-1 $\alpha$ -Hochregulation und Stabilisierung mittels Desferrioxamin .....	64
3.9. Osteogene Differenzierung von hMSC unter HIF-1 $\alpha$ -Regulation .....	65

<b>4. Diskussion .....</b>	<b>72</b>
4.1. Hypoxie als Chance und Hürde im Rahmen des zellbasierten <i>Tissue Engineering</i> .....	72
4.2. Sicherstellung definierter Sauerstoffkonzentrationen im Kulturmedium und auf Zellniveau.....	72
4.3. Hypoxie hat keinen negativen Einfluss auf das zelluläre Proliferationsverhalten .....	74
4.4. Anoxie und HIF-1 $\alpha$ .....	76
4.5. Hypoxie erleichtert die Bewahrung des Stammzellcharakters in hMSC .....	77
4.6. Hypoxie verhindert die osteogene Differenzierung von hMSC .....	78
4.7. Hypoxie und HIF-1 $\alpha$ -Expression .....	80
4.8. Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf die osteogene Differenzierung von hMSC.....	83
4.9. SCP-1, ein Stamm immortalisierter hMSC als Modellsystem.....	85
4.10. Ausblick.....	88
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>92</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>94</b>
Anhang.....	107
Abkürzungsverzeichnis.....	107
Danksagung .....	109
Publikationen:.....	110
Eidesstattliche Versicherung .....	113

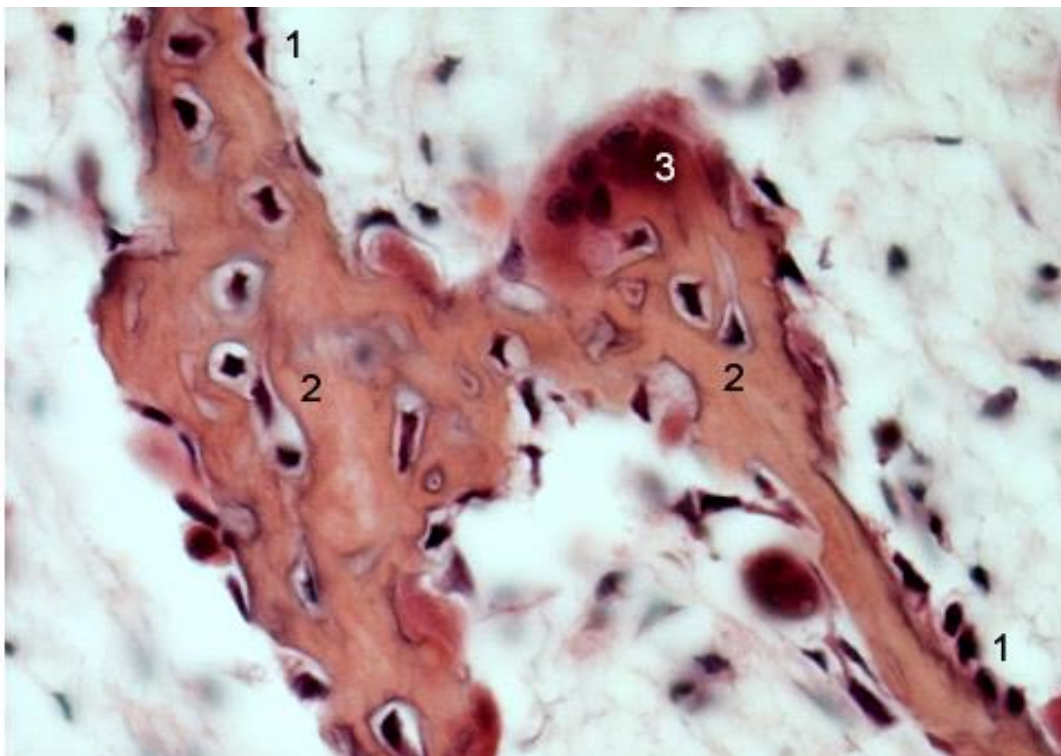
## 1. Einleitung

### 1.1. Struktur und Funktion von Knochengewebe

Knochen ist ein gut vaskularisiertes Stützgewebe, das zur Stabilisierung und Bewegung des Skeletts, sowie zum Schutz der inneren Organe, der Lunge, des Herzens und des Gehirns dient. Darüber hinaus dient Knochen als Kalziumreservoir, Widerlager und Anhaftungsgrund für Muskeln, Bänder und Sehnen (Cohen, Jr., 2006). Knochengewebe besteht weitestgehend aus einer hoch organisierten extrazellulären Matrix (EZM), die zum Großteil aus mineralischen (Hydroxylapatit) und organischen Bestandteilen (Kollagen) zusammengesetzt ist. Die vorherrschenden Zelltypen sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Abb. 1). Osteoblasten leiten sich von mesenchymalen Stammzellen ab und produzieren den Großteil der organischen Bestandteile im Knochen. Zusätzlich sind sie vornehmlich über Interleukin 6 (IL-6), Prostaglandin E2 (PGE2), Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANK-L) und RUNT Related Protein 2 (RUNX2) an der Regulierung der Osteoklastentätigkeit beteiligt und exprimieren Gene für die Kalzifizierung der organischen Matrix (Liu et al., 2005). Osteoblasten sind große, einkernige Zellen mit einem Durchmesser von 20-30 $\mu$ m. Typische osteoblastäre Marker sind Kollagen Typ I (Col I), Alkalische Phosphatase (ALP) und RUNX2 (Nakashima und de Crombrughe, 2003). Osteoblasten, die komplett von EZM umschlossen sind, reifen zu Osteozyten aus. Dies ist der häufigste und langlebigste Zelltyp im Knochengewebe. Osteozyten befinden sich in den Lakunen innerhalb der Lamellen, wohingegen sich Osteoblasten und Osteoklasten an der Oberfläche des Knochens befinden.

Die Osteozyten bleiben über sternförmige Ausläufer in den *Canaliculi* miteinander verbunden und kommunizieren dort über *Gap Junctions*. Man geht davon aus, dass sie Schädigungen am Knochen wahrnehmen können und Signale aussenden, die zu einem adäquaten *Remodelling* des Knochens führen (Castillo und Jacobs, 2010; Seeman und Delmas, 2006; Han et al., 2004). Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen und leiten sich vom monozytären Phagozytensystem ab. Ihre Hauptaufgaben liegen in der Resorption und im Umsatz von Knochengewebe. Dieses balancierte Wechselspiel zwischen Knochenneubildung durch Osteoblasten und Knochenabbau durch Osteoklasten ist wichtig um die Festigkeit und Elastizität

des Knochengewebes im Erwachsenenalter zu garantieren. Osteoblasten und Osteoklasten kommunizieren über Transmembranproteine und Integrine miteinander, die die Zellen aneinander koppeln, sowie über sezernierte Interleukine und lösliche Proteine wie RANK-L, das die Osteoklastenaktivität reguliert. So wird das gesamte Skelett in 7 Jahren etwa einmal komplett regeneriert.



**Abb. 1** Knochen, Struktur und Funktion

Knochen ist ein gut vaskularisiertes Stützgewebe, das zur Stabilisierung und Bewegung des Skeletts, sowie zum Schutz der inneren Organe dient. Es handelt sich weitestgehend um eine hoch organisierte extrazelluläre Matrix, die zum Großteil aus mineralischen (Hydroxylapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) und organischen Bestandteilen (Kollagen) zusammengesetzt ist. Die vorherrschenden Zelltypen sind (1) Osteoblasten (2) Osteozyten und (3) Osteoklasten. Freundlicherweise überlassen von Herrn Prof. Bartels; Modifiziert nach <http://www.anatomie-muc.de/studenten/studiumhistologie.php> (desmale Ossifikation: Kopf eines Feten)

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einer organischen und einer anorganischen Phase. Die organische Phase wird als Osteoid bezeichnet und besteht zum größten Teil aus Kollagen Typ I, sowie Proteoglycanen, Glycoproteinen, Plasmaproteinen und Wachstumsfaktoren. Der mineralische Teil besteht weitestgehend aus Hydroxylapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  und Einlagerungen von Spurenelementen wie



Magnesium, Natrium, Kalium, Mangan und Fluorid (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006a; Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al., 2006b). Hinsichtlich ihrer Architektur lassen sich zwei verschiedene Arten von Knochengewebe unterscheiden.

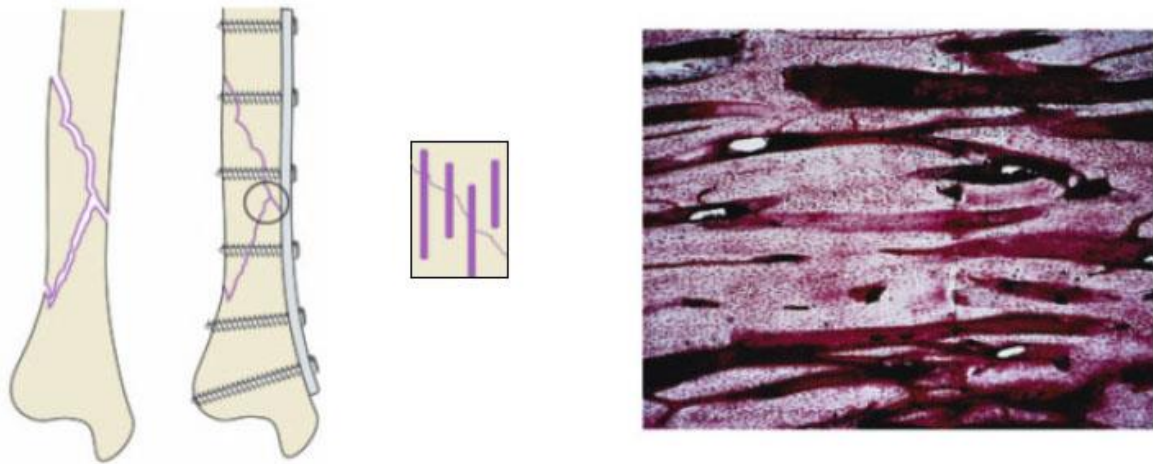
Durch desmale und chondrale Ossifikation sowie bei der Heilung von Knochenbrüchen entsteht zunächst Geflecht- oder Faserknochen. Hier sind die Kollagenfibrillen in der Knochengrundsubstanz noch ungeordnet. Faserknochen haben ein großes Wachstumspotenzial, jedoch eine geringe mechanische Festigkeit. Durch mechanische Beanspruchung (sog. formative Reize) kommt es in den ersten Lebensjahren zum Umbau in den stabileren Lamellenknochen. Lamellenknochen ist in Osteonen organisiert und kann sowohl als kortikaler sowie als spongiöser, trabekulärer Knochen vorliegen. Der lamelläre Aufbau der Osteone ist in der Kortikalis besonders gut sichtbar. Die Spongiosa wird von Kortikalis umhüllt und bildet ein engmaschig vernetztes Gerüst, wobei die meisten Knochenbälkchen entlang der wichtigsten Belastungslinien, den Spannungstrajektorien, des Knochens angeordnet sind (Lefebvre und Bhattaram, 2010; Eriksen, 2010; Kneser et al., 2006).

## 1.2. Frakturheilung

### 1.2.1. Primäre Frakturheilung

Nach einer Fraktur findet die primäre Knochenheilung nur statt, wenn es unverzüglich und ohne die Bildung eines Granulationsgewebes zu einer Wiederherstellung der Knochenkontinuität kommt (Phillips, 2005). Sie kann jedoch nur ablaufen, wenn die Fragmentenden direkten Kontakt miteinander haben, die Durchblutung intakt, und eine hohe Stabilität der Frakturrenden gewährleistet ist. Diese Situation besteht nur nach einer korrekten Reposition mit adäquater Stabilisierung im Frakturspalt. Im Wesentlichen findet die primäre Knochenheilung durch Wiederherstellung konnektiver Havers-Systeme im kortikalen Knochen statt. Diese eigenständigen *bone-remodelling-units* stellen die mechanische Kontinuität wieder her und werden als *cutting cones* bezeichnet (McKibbin, 1978). Aus humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) und *vascular endothelial cells* entstehen Osteoprogenitorzellen, die zu Osteoblasten differenzieren und letztendlich

Geflechtknochen bilden. Dieser wird im weiteren Verlauf durch Lamellenknochen ersetzt. Damit die primäre Knochenheilung erfolgreich ablaufen kann, sind eine gute Durchblutung, ein Frakturspalt von weniger als 2mm und eine minimale Bewegung der Fraktur (d.h. Ruhigstellung) essenziell (Abb. 2).

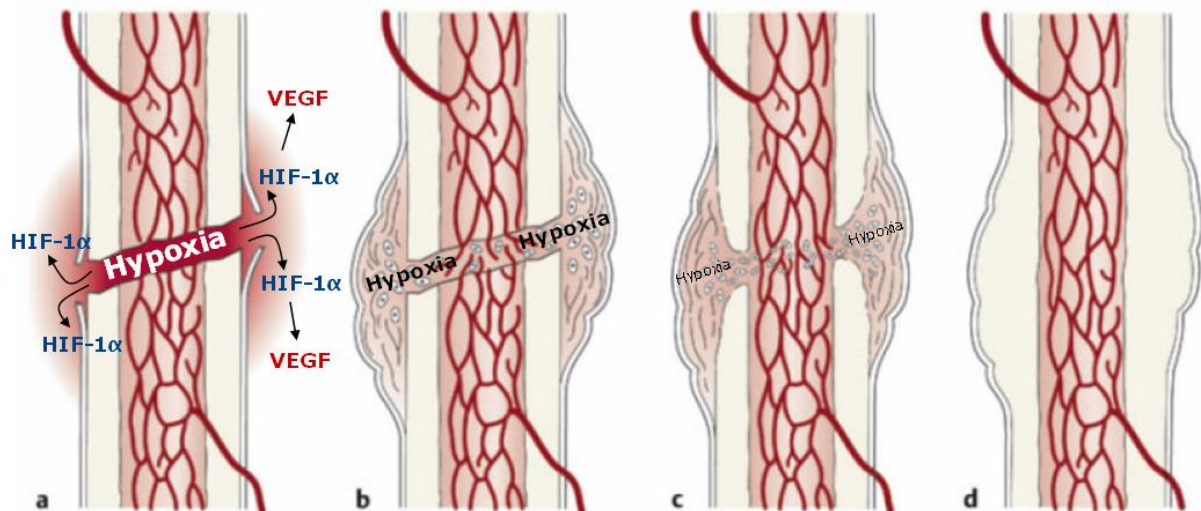


**Abb. 2** Primäre Frakturheilung

Primäre Frakturheilung ist die Bildung neuen Knochengewebes ohne zwischenzeitliche Bildung von Kallusgewebe. Damit die primäre Knochenheilung erfolgreich ablaufen kann, sind eine intakte Durchblutung, direkter Kontakt der Fragmentenden, ein Frakturspalt von weniger als 2mm, adäquate Stabilisierung und eine minimale Bewegung der Fraktur essenziell. Die Heilung findet insbesondere in der Kortikalis durch Wiederherstellung konnektiver Havers-Systeme statt. Diese eigenständigen *bone-remodelling-units* stellen die mechanische Kontinuität wieder her und werden als *cutting cones* bezeichnet (McKibbin, 1978). Abb. modifiziert nach Henne-Bruns, Düring, Kremer Duale Reihe Chirurgie 3., vollst. überarb. Aufl. 2007 (Henne-Bruns D. et al., 2007)

### 1.2.2. Sekundäre Frakturheilung

Ist es in einer Defektzone zusätzlich zum Verlust der Knochenkontinuität zu einem Substanzverlust gekommen, läuft in der Regel die sekundäre, indirekte Knochenheilung ab (Gaston und Simpson, 2007). Dieser komplexe Vorgang lässt sich in unterschiedliche Phasen gliedern. In der Frühphase bildet sich als Folge der in der Frakturzone auftretenden Blutung ein Frakturhämatom, woran sich eine entzündliche Phase mit gesteigerter Immigration verschiedener Zelltypen (unter anderem Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten, Fibroblasten) anschließt.



**Abb. 3** Sekundäre Frakturheilung

- a.) Initiale Verletzungsphase
- b.) Entzündungsphase (3-14 Tage)
- c.) Phase der Kallushärtung (Wochen bis Monate)
- d.) Remodelling Phase (1-2 Jahre) (Niethard F.U. et al., 2009)

Bei Frakturen mit Substanzverlust findet die sekundäre oder indirekte Knochenheilung statt. In der Frühphase bildet sich als Folge der in der Frakturzone auftretenden Blutung ein Frakturhämatom, woran sich eine entzündliche Phase mit gesteigerter Immigration verschiedener Zelltypen anschließt. Die hypoxiegetriggerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine induziert eine gesteigerte Angiogenese im Wundheilungsgebiet und eine verstärkte Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen. Darauf folgt zunächst die Bildung eines Kallusgewebes, welches die Frakturrenden verbindet und eine gewisse Stabilität verleiht. Anschließend wird dieses Regenerationsgewebe kalzifiziert und zu Knochen umgebaut. Abb. modifiziert nach Henne-Bruns, Düring, Kremer Duale Reihe Chirurgie 3., vollst. überarb. Aufl. 2007 (Henne-Bruns D. et al., 2007)

Hypoxie und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine induzieren eine gesteigerte Angiogenese im Wundheilungsgebiet und eine verstärkte Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und Progenitorzellen via *Stromal Cell Derived Factor-1* (SDF-1) (Keramaris et al., 2008; Ceradini et al., 2004).

Darauf folgt zunächst die Bildung eines Granulationsgewebes, welches im Zeitverlauf durch knorpeliges Kallusgewebe ersetzt wird. Dieses Reparationsgewebe verbindet die Frakturrenden und verleiht eine gewisse Stabilität. Es ist jedoch mechanisch deutlich weniger belastbar als intaktes Knochengewebe (Einhorn et al., 2008; Einhorn, 2005). Im Falle einer physiologischen Knochenheilung kommt es unter

Beteiligung von Induktoren der Knochenheilung wie OSTEOCALZIN oder *Bone Morphogenic Proteins* (BMP), Interleukinen und Wachstumsfaktoren (Niethard F.U. et al., 2009) zunächst zu einer Kalzifizierung des Kallusgewebes, das dann über Geflecht- zu Lamellenknochen umgebaut wird, wodurch die knöcherne Konsolidierung eintritt. Daran schließen sich umfangreiche Remodellierungsprozesse an, wie sie auch jederzeit am intakten Skelett stattfinden, so dass der Knochen letztlich in seinem trajektorialen Aufbau die auftretenden Zug- und Druckbelastungen widerspiegelt und im Idealfall nicht nur die Knochenkontinuität, sondern auch die Funktionalität vollständig wiederhergestellt ist (Abb. 3) (Einhorn, 2005; Bruder et al., 1997).

### **1.3. Klinische Problematik:**

#### 1.3.1. Ausbleibende Frakturheilung aufgrund Pseudoarthrosenbildung

Neben mechanischen Faktoren wie zu große Beweglichkeit der Frakturrenden, können biologische Ursachen wie Deperiostierung, Pharmaka (Zytostatika, Steroide) und Radiotherapie zu Heilungsstörungen führen. Man unterscheidet verschiedene Formen der ausbleibenden Frakturheilung, sowie Knochendefekte. So liegt bei der *Delayed Union*, der verzögerten Heilung 4 – 6 Monate nach dem Trauma eine verspätete Überbauung mit verzögerter Konsolidierung der Fraktur, bei zunächst erweiterten Frakturspalten vor. Weist eine Fraktur nach 6 – 8 Monaten lediglich eine fibröse Verbindung ohne knöcherne Durchbauung auf, spricht man von einer Pseudoarthrose. Diese wird in atrophe und hypertrophe Formen eingeteilt. Bei der reaktiven, hypertrophen Pseudoarthrose kommt es durch unkontrollierte mechanische Unruhe im Frakturgebiet und guter Durchblutungssituation der Frakturenden zu überschießender Kallusbildung. Diese Form macht etwa 90% aller Pseudoarthrosen aus. Bestehen im Frakturgebiet stattdessen schlechte Durchblungsverhältnisse, sowie Nekrosen, kommt es zur Ausbildung einer atrophischen Pseudoarthrose, die durch fehlende Kallusbildung charakterisiert ist. Besonders im Rahmen infizierter Pseudoarthrosen (Infektpseudoarthrose) kann es bei instabiler Osteosynthese, lockerem Osteosynthesematerial, insuffizienter Durchblutung und Drehkeilen (lose Knochensequester) zu ausgedehnten Osteolysen mit großen Knochensubstanzdefekten kommen. Diese werden als

Defektpseudoarthrosen bezeichnet (Niethard F.U. et al., 2009; Henne-Bruns D. et al., 2007).

### 1.3.2. Knochendefekte

Ausgedehnte Knochendefekte stellen eine erhebliche Belastung für das Gesundheitswesen dar. Auch für die rekonstruktive Chirurgie sind sie nach wie vor eine große Herausforderung. Derartige skelettale Defekte können angeboren oder genetisch bedingt sein. Desweiteren können sie iatrogen im Rahmen der chirurgischen Behandlung entstehen, beispielsweise bei der E nukleation von Knochenzysten, bei Defektpseudoarthrosen, durch Infektionen oder Tumoren und vor allem posttraumatisch bedingt sein (Jäger et al., 2010; Schieker und Mutschler, 2006; Slater et al., 2008). Überschreitet der Defekt eine kritische Größe, oder wird die Knochenheilung durch mechanische oder metabolische Umstände behindert, so kann es im klinischen Alltag zur Notwendigkeit des Ersatzes von Knochengewebe kommen (Schieker und Mutschler, 2006). Es existiert eine Reihe von morphologischen Kriterien zur Einteilung ossärer Defekte. Hinsichtlich der Therapieentscheidung spielt hierbei neben der Länge, der Breite und der Tiefe der Verletzung auch die Lokalisation des Defekts, sowie eine eventuelle Gelenkbeteiligung eine wichtige Rolle. Desweiteren sind die biomechanischen Eigenschaften der betroffenen Knochen und des umliegenden Gewebes, sowie die Lagerqualität und insbesondere die lokale Vaskularisierung für die Behandlung und Heilung entscheidend (Schieker und Mutschler, 2006). Wenn die Ausdehnung eines Knochendefekts eine gewisse Größe überschreitet, bleibt die Bildung von Knochengewebe in der Defektzone aus. Es besteht eine Heilungsstörung, die einer zusätzlichen therapeutischen Versorgung bedarf. Derartige Szenarien stellen für die behandelnden Chirurgen immer wieder eine Herausforderung dar. In den letzten Jahren hat die erhöhte Inzidenz von Knochendefekten zu einer erheblichen Belastung für das Gesundheitswesen geführt (Slater et al., 2008; Pientka, 2004). Besonders die zunehmende Überalterung der Bevölkerung in den Industrienationen macht die Versorgung von Knochenverletzungen und Skeletterkrankungen zu einer immer wichtigeren Aufgabe. Diesbezügliche Prognosen stimmen darin überein, dass sich die Anzahl der an Knochenerkrankungen leidenden Personen über 50 Jahre, bis 2020 verdoppeln wird (Navarro et al., 2008). Auf die verschiedenen Therapieoptionen soll im Folgenden eingegangen werden.

### 1.3.3. Therapieoptionen

#### 1.3.3.1. Autologe Knochentransplantation

Im Falle segmentaler Knochendefekte ist die autologe Knochentransplantation nach wie vor der Standard der Therapie (Schieker und Mutschler, 2006; Kneser et al., 2006). Hierbei wird über einen zusätzlichen operativen Eingriff Knochenmaterial entnommen, um dann in der Folge in die Defektzone transplantiert zu werden (Jäger et al., 2005). Beim Patienten erfolgt die Entnahme unter anderem aus der Darmbeinschaukel, dem Trochanter major, dem distalen Radiusbereich oder auch der proximalen Tibiametaphyse. Der große Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie alle drei wesentlichen Aspekte der Knochenregeneration abzudecken vermag:

##### Osteoinduktion:

Mit den im Transplantat enthaltenen, mesenchymalen Stammzellen, liefert ein autologes Knochentransplantat osteogene Progenitorzellen.

##### Osteokonduktion:

Die poröse Oberfläche der Transplantatmatrix schafft Voraussetzungen für das Anheften und die Proliferation von Knochen bildenden Zellen.

##### Osteogenität:

Das Transplantat liefert die nötigen Voraussetzungen wie induktive Wachstumsfaktoren, um Knochen bildende Zellen zu versorgen (Bernstein et al., 2009).

All diese Eigenschaften machen autologe Knochentransplantate zum Mittel erster Wahl bei Knochenrekonstruktionen (Bernstein et al., 2009; Lind und Bunker, 2001). Wenngleich diese Methode häufig als „Goldstandard“ der Therapie (Laurencin et al., 2006) bezeichnet wird, birgt sie jedoch erhebliche Schwierigkeiten. Die Menge des zu gewinnenden Knochens ist biologisch limitiert (Volkmer et al., 2008). Die

Transplantatqualität kann insbesondere bei älteren Patienten, Patienten mit rheumatischen Erkrankungen oder Patienten mit Osteoporose reduziert sein. Bei Kindern besteht die Gefahr einer Verletzung der Wachstumsfugen. Die Hebedefektmorbidität kann sich in weiteren Komplikationen wie Infektionen oder chronischen Schmerzen niederschlagen (Khan et al., 2008). Postoperative Schmerzen und verlängerte Rehabilitationszeiten sind häufig. Zusätzliche Narbenbildungen sind für die Betroffenen nicht zu vermeiden. All diese Einwände sind nicht nur im Sinne einer optimalen Patientenversorgung zu bedenken, sondern müssen auch hinsichtlich ökonomischer Aspekte (Material- und Personalaufwand, evtl. verlängerte Krankenhausaufenthalte) berücksichtigt werden.

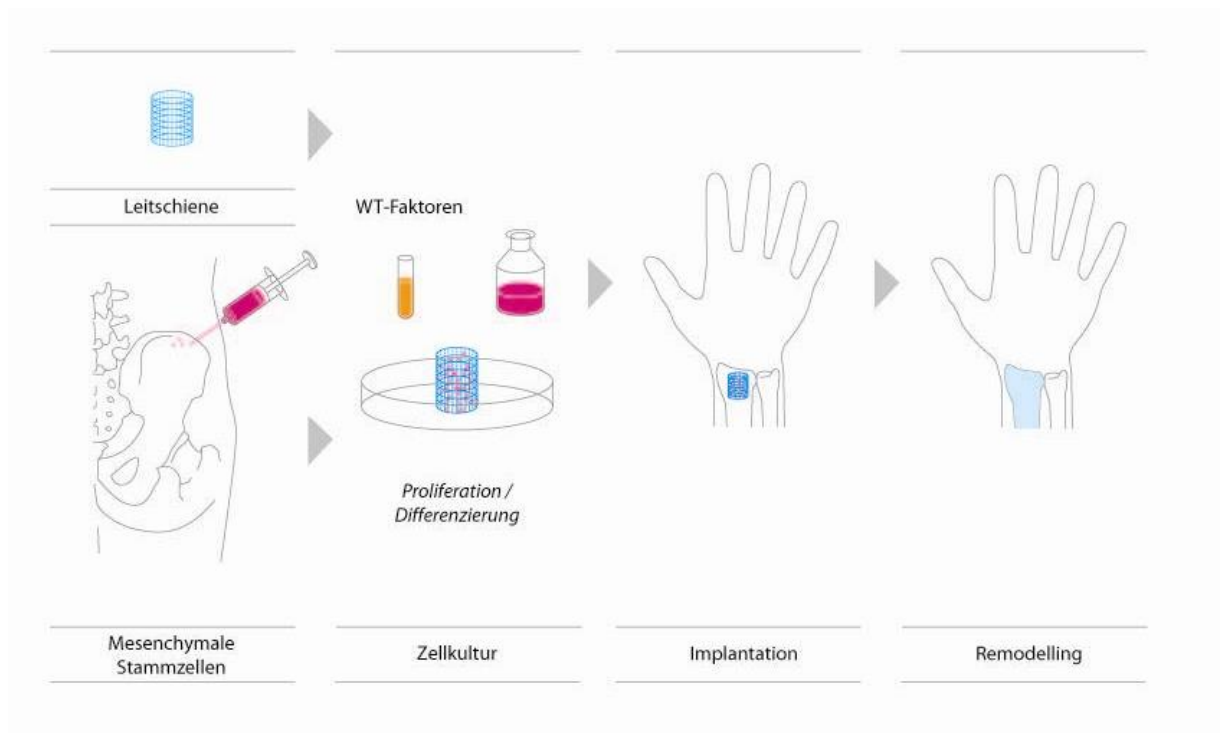
Alternativ kann im Einzelfall auf eine freie Fibulatransplantation oder einen Segmenttransport zurückgegriffen werden. Hier sind die unerwünschten Begleiterscheinungen jedoch ungleich höher. Es besteht auch die Möglichkeit der Transplantation allogenen Knochenmaterials (De Long et al., 2007). Grundsätzlich wird in diesem Zusammenhang zwischen den selteneren „frischen“ sowie den prozessierten Transplantaten unterschieden. Dabei geht im Rahmen der Prozessierungsschritte biologische Aktivität verloren. Auch das potentielle Risiko viral oder bakteriell übertragbarer Krankheiten, wie Hepatitis B, C, oder HIV darf nicht vergessen werden (Hing, 2004). Die Schwierigkeit dieser Therapieoption ist nicht zuletzt darin zu sehen, dass kostenintensive und in der Betreuung sehr zeitaufwändige Knochenbanken gepflegt werden müssen, um adäquates Material von geeigneten Spendern zur Verfügung zu haben (Kirker-Head et al., 2007; Tomford, 2000).

#### 1.3.3.2. Regenerative Therapiestrategien: *Tissue Engineering* (TE) von Knochengewebe

Neue Biomaterialien, wie Scaffolds für das *Tissue Engineering* (TE) von Knochen dienen zur Erhaltung der biologischen Funktionen, indem sie die verschiedenen Knochentypen ersetzen oder sogar die körpereigene Knochenheilung befördern und dirigieren. Darüber hinaus sehen einige neuartige Therapiestrategien vor, durch Transplantation metabolisch aktiver Zellen, Applikation heilungsfördernder Proteine (zum Beispiel *bone morphogenetic proteins* (BMP), *fibroblast growth factor* (FGF)), oder im Rahmen genbasierter Therapien Faktoren einzubringen, die sich positiv auf

den Heilungsverlauf auswirken (Hidaka et al., 2006; Olivier et al., 2004). Das so genannte *Tissue Engineering* weckt in diesem Zusammenhang große Hoffnungen, da es über interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedenster Fachrichtungen Kompetenzen bündelt und so die noch offen stehenden Fragen bezüglich der Entwicklung artifizierender Gewebeersatzmaterialien in absehbarer Zeit zu beantworten versucht (Langer und Vacanti, 1993). Das Grundprinzip dieses Verfahrens besteht darin, pluripotente vitale Zellen mit geeigneten Trägermaterialien und Wachstumsfaktoren bereits vor der Transplantation *in vitro* zusammenzuführen (Abb. 4). Durch die Kombination von stabilen Trägermaterialien mit metabolisch aktiven Zellen soll einerseits eine suffiziente Stabilität und andererseits eine bessere Integration des Transplantats in das Empfängergewebe erreicht werden. Ein Grundprinzip des *Tissue Engineering* ist es, dem Patienten körpereigene multipotente Zellen zu entnehmen, sie *in vitro* zu vermehren und auf Trägermaterialien aufzubringen. Anschließend können die hMSC zu den spezifischen Zellen der jeweiligen Gewebe differenziert werden. Dadurch wird die Bildung extrazellulärer Matrix induziert, so dass das besiedelte Konstrukt schließlich als Gewebeersatz implantiert werden kann.





**Abb. 4** Prinzip des *Tissue Engineering*

Durch Knochenmarksaspiration werden autologe Stammzellen gewonnen. Die mesenchymalen Stammzellen werden isoliert und ihre mesenchymalen Stammzeleigenschaften nachgewiesen. Sie werden *in vitro* kultiviert und bis zur gewünschten Zellzahl vermehrt. Über die Kombination adäquater Trägermaterialien, metabolisch aktiver Zellen und heilungsfördernder Wachstumsfaktoren kann bereits *in vitro* begonnen werden künstliches Gewebe zu erzeugen. Dieses soll nach Implantation zum einen die Primärstabilität erhöhen und zugleich eine bessere Integration in das Empfängergewebe gewährleisten. Auf diese Art wird *in vivo* der Heilungsprozess unterstützt, so dass es zu einem kompletten Remodelling des Defektbereiches und einer *restitutio ad integrum* kommt. Modifiziert nach Drosse 2008.

### 1.3.4. Stammzellen

Stammzellen finden sich in fast allen höheren, vielzelligen Organismen und sind charakterisiert durch ihr Potenzial zu theoretisch unbegrenzter Selbstreplikation und ihre Fähigkeit sich in eine Vielzahl verschiedener Zelltypen differenzieren zu können. Man unterscheidet embryonale und adulte Stammzellen.

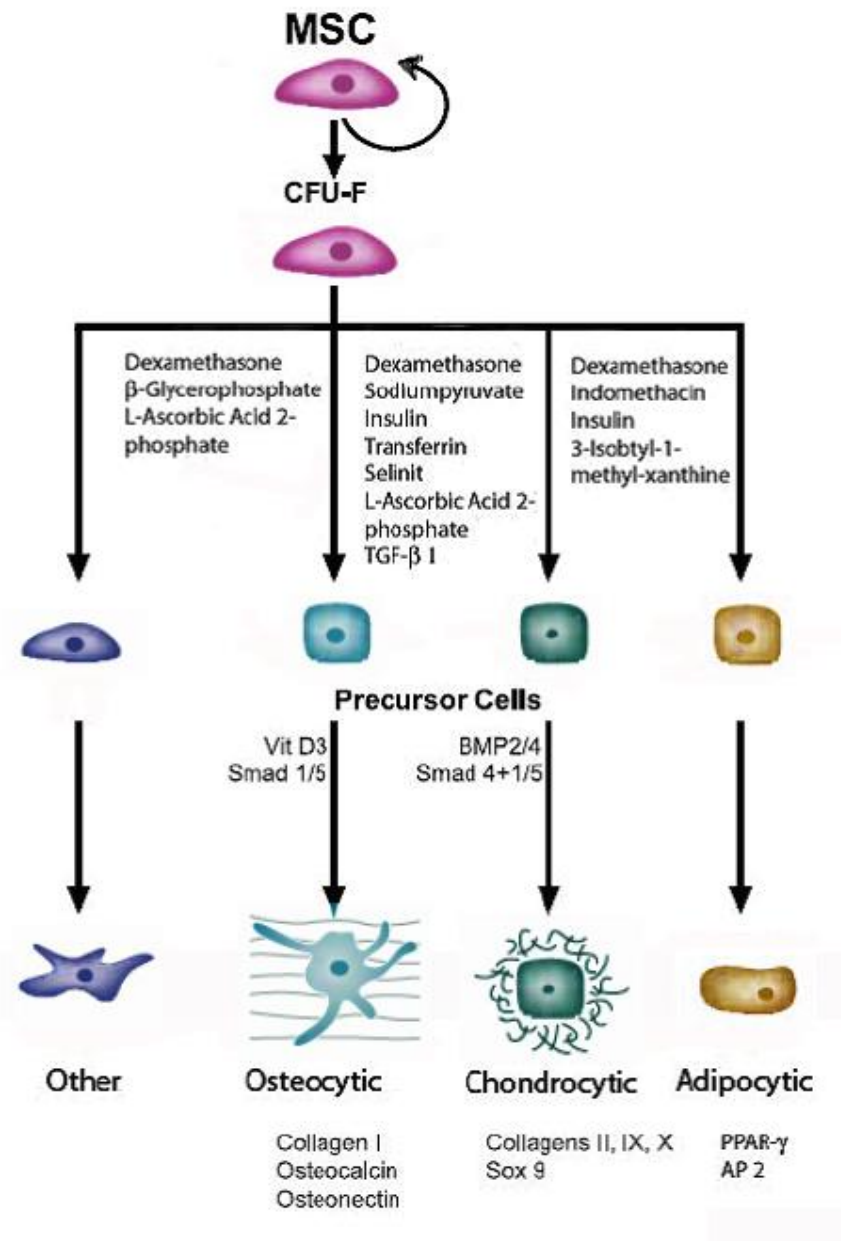
#### 1.3.4.1. Embryonale Stammzellen (ES)

Embryonale Stammzellen (ES) sind bekannt für Ihre Pluripotenz. Sie werden während der Gastrulation aus der inneren Zellmasse des Blastozysten gewonnen. ES besitzen die einzigartige Fähigkeit sich in alle Gewebe der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) differenzieren zu können. Jedoch sind sie, im Gegensatz zu totipotenten Stammzellen, nicht mehr in der Lage, einen gesamten Organismus zu bilden, da pluripotente Stammzellen keine extraembryonalen Gewebe bilden können. Es wurde gezeigt, dass sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* osteogen differenzieren können (Bielby et al., 2004; Karner et al., 2009; Karner et al., 2007; Tremoleda et al., 2008). Obwohl ES durch ihre Pluripotenz für Anwendungen im *Tissue Engineering* prädestiniert sind, werden sie selten verwendet. Dies ist ihrer ethisch umstrittenen Gewinnung aus Embryonen und der Gefahr einer Entstehung von Teratomen und Teratokarzinomen zuzuschreiben (Blum B und Benvenisty N., 2008; Goldring CE et al., 2011). Aus diesem Grund wurden große Forschungsanstrengungen unternommen, um andere Quellen postnataler, multipotenter Zellen zu finden.

#### 1.3.4.2. Humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Eine solche Quelle und damit adäquate Zellen für diese Therapiestrategie stellen die adulten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) dar. Ebenso wie embryonale Stammzellen besitzen auch adulte Stammzellen theoretisch die Möglichkeit zur unendlichen Zellvermehrung (Selbstreplikation), sowie die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Gewebearten (Plastizität) (Kassem, 2006; Liechty et al., 2000; Pittenger et al., 1999). Während aus pluripotenten, embryonalen Stammzellen alle Gewebearten entstehen können, lassen sich adulte, multipotente Stammzellen nur noch in einige spezialisierte Gewebe wie Knochen-, Knorpel-, und

Fettgewebe differenzieren (Abb. 5) (Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997). Ihr großer Vorteil besteht jedoch in ihrer einfachen Gewinnung. Sie werden vielfach aus Knochenmarksaspiraten isoliert (Beltrami et al., 2007; Ciapetti et al., 2006). hMSC können jedoch auch aus Fettgewebe (Schaffler und Buchler, 2007), Muskelgewebe (Peng und Huard, 2004), Nabelschnurblut (Nagano et al., 2010), Amnionflüssigkeit, oder dem peripherem Blut gewonnen werden (Kuznetsov et al., 2001). Aufgrund ihres hohen proliferativen Potenzials können diese Zellen zudem in nahezu unbegrenzter Menge expandiert werden (Abb. 4). Obwohl die Wissenschaft hier in den vergangenen Jahren große Fortschritte erzielt hat, wurde bislang noch kein spezifischer Marker gefunden, um hMSC sicher von den übrigen Zellen zu unterscheiden. Derzeit gelten die Kriterien der *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* zur Definition mesenchymaler Stammzellen. Nach deren Kriterien müssen MSC auf Plastikoberflächen adhärent sein, und zu mehr als 95% die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren. MSC dürfen dabei gleichzeitig nicht die Oberflächenantigene CD45, CD34 und CD14 exprimieren und müssen osteogen, chondrogen und adipogen differenzierbar sein. Dies muss durch entsprechende Färbungen nachgewiesen werden (Dominici et al., 2006; Haasters et al., 2009).



**Abb. 5** Merkmale mesenchymaler Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbstreplikation, und zur Ausbildung von *colony-forming-units* (CFU). Eine derartige *colony-forming-unit* kann sich je nach Stimulus in eine Vielzahl verschiedener Gewebetypen, vornehmlich des Stütz- und Bindegewebes differenzieren. Gezeigt ist hier die für mesenchymale Stammzellen charakteristische Differenzierbarkeit in Knochen-, Knorpel-, und Fettgewebe. Modifiziert nach (Otto und Rao, 2004)

#### 1.3.4.3. Immortalisierte hMSC (SCP-1)

Neben unveränderten hMSC wurde für zahlreiche Experimente eine laboreigene Zelllinie immortalisierter hMSC verwendet. Diese wurde mittels lentiviralen Gentransfers von einer *humanen Telomerase reverse Transcriptase* (hTERT) unter einem konstitutiven Promotor aus hMSC entwickelt. Wir bezeichnen diese Zellen als *Single Cell Picked Clone-1* (SCP-1). Die Übertragung von hTERT mit konstitutivem Promotor verhindert den seneszenzbedingten Wachstumsarrest, der bei hMSC *in vitro* nach etwa 24-40 Populationsverdopplungen erreicht wird (Bruder et al., 1997; Digirolamo et al., 1999; Schallmoser et al., 2010; Banfi et al., 2000). Wir konnten ebenfalls zeigen, dass sich SCP-1 weiterhin osteogen, chondrogen und adipogen differenzieren ließen und die Zellen selbst nach zwei Jahren in Kultur noch keinerlei Zeichen maligner Transformation aufwiesen (Böcker et al., 2008).

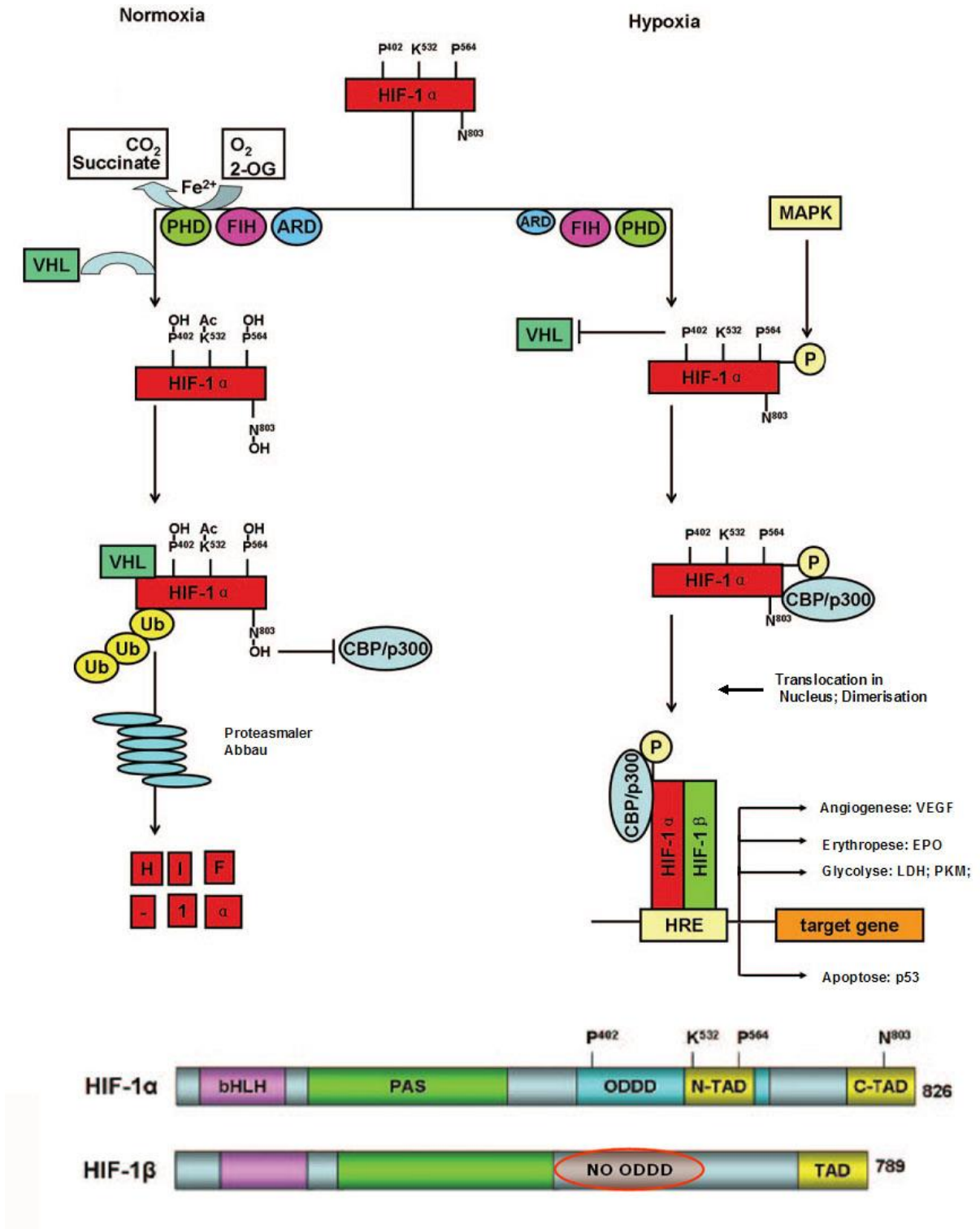
#### 1.3.5. Hypoxie in *Tissue Engineering* und Regenerativer Medizin

Obwohl die Idee des *Tissue Engineering* schon seit einigen Jahren besteht, bleibt ihre breite klinische Umsetzung bislang noch aus. Eine der Hauptschwierigkeiten ist die verminderte Versorgung implantierter Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, die letztendlich zum Absterben der Zellen führt (Volkmer et al., 2008).

Während eine unkontrollierte Hypoxie im *Tissue Engineering* problematisch ist, scheint die Hypoxie in einer Fraktursituation ein wichtiges Stimulans zu sein. Bei einem Knochenbruch wird auch die Blutversorgung unterbrochen. Hier triggert das entstehende hypoxische Milieu allerdings die Knochenheilung und verknüpft so die Hypoxie mit der osteogenen Differenzierung von hMSC (Giannoudis et al., 2007). Es ist also evident, dass diejenigen Zellen, die zur Knochenheilung beitragen, sowohl physiologischerweise in Frakturen, als auch im Rahmen von *Tissue Engineering*, einem hypoxischen Milieu ausgesetzt sind (Volkmer et al., 2008; Giannoudis et al., 2007). Unter hypoxischen Bedingungen aktivieren Zellen hierbei eine komplexe Signalkaskade, in der der *Hypoxia-Inducible-Factor-1-alpha* (HIF-1 $\alpha$ ) eine dominierende Rolle spielt (Ke und Costa, 2006; Semenza, 1998; Semenza, 1999; Wang et al., 2007).

### 1.3.6. HIF-1 $\alpha$

HIF-1 $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor, der wie auch HIF-2 $\alpha$  zur Familie der *helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim* (bHLH-PAS) Proteinen gehört. HIF-1 $\alpha$  liegt auf dem langen Arm (q) des Chromosom 14 und besitzt ein Molekulargewicht von 93533 Da (Ke und Costa, 2006). HIF-1 $\alpha$  wurde erstmals 1992 entdeckt und dient zur Anpassung des Zellmetabolismus an reduzierte Sauerstoffkonzentrationen (Ytrehus, 2008). Im Rahmen der Embryonalentwicklung ist HIF-1 $\alpha$  essenziell, da Embryonen mit komplettem HIF-1 $\alpha$  Knock-Out bereits *in utero* absterben (Iyer et al., 1998). HIF-1 $\alpha$  ist nur bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen stabil und dimerisiert unter Hypoxiebedingungen mit HIF-1 $\beta$ . Der Heterodimer aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  wird ins Innere des Zellkerns transloziert, wo er an Hypoxie-Responsive-Elemente (HRE) bindet. Vielen Genen, die für die Zellhomöostase unter reduzierten Sauerstoffbedingungen wichtig sind, ist ein HRE im Promotor vorgeschaltet. Hierzu gehören Gene der Glykolyse, der Erythropoese und Angiogenese, sowie der Apoptose. Bei hohem O<sub>2</sub>-Angebot wird HIF-1 $\alpha$  durch sauerstoffabhängige Prolylhydroxylasen (PHD) an den Prolylresten seiner *oxygen dependent degradation domain* (ODDD) hydroxyliert. Nach der Hydroxylierung der Prolylreste innerhalb der ODDD kann das von Hippel-Lindau-Protein (pVHL), ein Tumorsuppressor-Protein, an HIF-1 $\alpha$  binden und setzt so eine Kaskade in Gang, die zur Ubiquitinylierung von HIF-1 $\alpha$  und damit zum Abbau durch Proteasomen im Zytosol führt (Abb. 6) (Ke und Costa, 2006; Semenza, 1998; Mangiavini et al., 2014). Die Prolylhydroxylasen besitzen ein Eisen(III)-Ion in ihrem katalytischen Zentrum und können durch starke Eisenchelatoren inaktiviert werden, die sie ihres Zentralions berauben. Auch Schwermetallionen wie Kobalt und Nickel können das Eisenion aus dem katalytischen Zentrum verdrängen, und so die PHD inaktivieren. Infolge kommt es nicht zur sauerstoffabhängigen Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 2004; Guo et al., 2006).



**Abb. 6** Regulation von HIF-1α durch die Sauerstoffkonzentration

Unter Normoxiebedingungen wird HIF-1α rasch hydroxyliert und im Zytosol abgebaut. Bei niedrigen O<sub>2</sub>-Konzentrationen entfällt die O<sub>2</sub>-abhängige Hydroxylierung der Prolylreste in der ODDD von HIF-1α. Infolge entfällt die Anlagerung von VHL, welche die Ubiquitinylierung und den Abbau im Proteasom nach sich zieht. HIF-1α ist unter Hypoxie stabil, dimerisiert mit HIF-1β und wird anschließend in den Nukleus transloziert. HIF-1β wird kontinuierlich exprimiert, besitzt selbst keine ODDD und ist damit

sowohl bei Normoxie, als auch bei Hypoxie stabil. Das Dimer aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  bindet im Kern an die HREs. Sie liegen auf der DNA innerhalb der Promotoren derjenigen Gene, die für den Zellmetabolismus bei niedrigen O<sub>2</sub>-Konzentrationen von Nutzen sind, z.B. VEGF, EPO oder LDH. Modifiziert nach (Ke und Costa, 2006)

Abkürzungen: ODDD: Oxygen dependent degradation domain

HRE: Hypoxia responsive element

PHD: Prolylhydroxylase

VHL: von Hippel Lindau Protein

VEGF: Vascular Endothelial growth factor

EPO: Erythropoietin

LDH: Laktatdehydrogenase

MAPK: Map-Kinase

### 1.3.7. Die Rolle von Hypoxie und HIF-1 $\alpha$ während der osteogenen Differenzierung

Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass Differenzierungsprozesse ebenfalls von Hypoxie beeinflusst werden (Volkmer et al., 2010; Grayson et al., 2006; Grayson et al., 2007; Fehrer et al., 2007; Malladi et al., 2007; Potier et al., 2007). Malladi et al. berichteten erstmals, dass bei Kultur von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe unter 2% O<sub>2</sub> eine verminderte osteogene Differenzierung auftrat (Malladi et al., 2007). Seitdem haben weitere Artikel bestätigt, dass die osteogene Differenzierung negativ von Sauerstoffmangel beeinflusst werden könnte (Malladi et al., 2007; Volkmer et al., 2008; Potier et al., 2007; Fehrer et al., 2007). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$ -Pathways die Neubildung von Knochen *in vivo* beschleunigt, was die Vermutung nahe legte, dass HIF-1 $\alpha$  ein Kofaktor während der Knochenbildung und Knochenheilung ist (Wan et al., 2008). Die HIF-Transkriptionsfaktoren spielen u.A. eine entscheidende Rolle bei der Gefäßbildung in hypoxischen Geweben durch eine Steigerung der Sekretion von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Wang et al., 2007). Im *in vivo* Modell von VHL-defizienten Mäusen ( $\Delta$ VHL-Mäusen) akkumuliert HIF-1 $\alpha$  Protein während der chondralen Ossifikation in Osteoblasten. Dies führt zu verstärkter Vaskularisierung und gut mineralisierten, langen Röhrenknochen. In HIF-1 $\alpha$ -defizienten Mäusen ( $\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Mäusen) kommt es dagegen zur Ausbildung schwach vaskularisierter und schwach mineralisierter Röhrenknochen. Die desmale Ossifikation der platten Schädelknochen wird hierbei jedoch nicht beeinflusst, weshalb man annimmt, dass die verstärkte Knochenbildung in langen



Röhrenknochen vor allem den sekundären *Target-Genen* von HIF-1 $\alpha$ , insbesondere dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), und damit dem Gefäßwachstum geschuldet ist (Wang et al., 2007; Wan et al., 2010). Vor Kurzem konnten Wan et al. jedoch zusätzlich nachweisen, dass die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$ -Pathways sehr früh im Rahmen der desmalen Ossifikation, die Neubildung von Kalvarienknochen aus mesenchymalem Bindegewebe *in vivo* direkt beschleunigt (Wan et al., 2008). Dies führt zur Vermutung, dass HIF-1 $\alpha$  auch ein direkter Kofaktor während der Knochenbildung *in vivo* ist. Die *in vivo* Analysen von Shomento konnten diese These jedoch nicht bestätigen. In HIF-1 $\alpha$  defizitären Osteoblasten, die dort aus  $\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Mäusen isoliert worden waren, war die Expression von HIF-1 $\alpha$  um mehr als 90% gegenüber den Normalkontrollen vermindert. Trotzdem ließen sich die  $\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Osteoblasten gut osteogen differenzieren. Auch das Expressionsniveau der knochentypischen Markergene RUNX2, OSTERIX und OSTEOCALZIN war ähnlich hoch wie das Expressionsniveau dieser Markergene in den Kontrollen bei HIF-1 $\alpha$ -exprimierenden Osteoblasten. Lediglich die Zellproliferation in  $\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Osteoblasten schien durch den HIF-1 $\alpha$ -Mangel direkt beeinträchtigt (Shomento et al., 2010). In einem weiteren *in vivo* Modell zeigte Ceradini, dass die Expression von HIF-1 $\alpha$ -Protein allerdings zur forcierten Rekrutierung von Progenitorzellen in hypoxischen Geweben führt. *Stromal Cell Derived Factor – 1* (SDF-1) wird hierbei durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  in direkter Abhängigkeit von lokal-niedrigen Sauerstoffkonzentrationen verstärkt exprimiert. SDF-1 führt infolge zu verstärkter Adhäsion, Migration und verbessertem Homing von Progenitorzellen in hypoxische Gewebe (Ceradini et al., 2004). Da offensichtlich ein Zusammenhang zwischen Hypoxie und osteogener Differenzierung besteht, der aber wahrscheinlich aufgrund von Kompensationsmechanismen in konstitutiv HIF-1 $\alpha$  defizienten Zellen nicht gezeigt werden konnte, verfolgten wir in der vorliegenden Studie den Ansatz einer transienten HIF-1 $\alpha$  Downregulation.

#### 1.4. Aufgabenstellung

In Anbetracht der Tatsache, dass HIF-1 $\alpha$  eine wichtige Rolle in der Skelettentwicklung spielt, liegt es nahe, dass auch die Knochenheilung mit osteogener Differenzierung, ausgehend von zur Heilung notwendigen mesenchymalen Stammzellen, durch HIFs gesteuert wird. Dies gilt umso mehr, als

bereits bewiesen werden konnte, dass Hypoxie einen negativen Effekt auf die osteogene Differenzierung hat (Volkmer et al., 2010; Potier et al., 2007). Unsere für das Projekt relevanten, eigenen Voruntersuchungen haben gezeigt, dass mit zunehmender Dicke in der 3D-Kultur Sauerstoffgradienten innerhalb eines Zell-Matrix-Konstrukts auftreten (Volkmer et al., 2008). Ein wichtiger nächster Forschungsschritt war es nun, den Einfluss der von uns im 3D-Konstrukt beobachteten Hypoxie und der damit wahrscheinlich einhergehenden Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  auf die osteogene Differenzierung zu untersuchen. Unsere Hypothese war hierbei, dass die in Zellkultur und Frakturen gleichermaßen auftretende Hypoxie über eine HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung zu einer Beeinflussung der osteogenen Differenzierung führt.

Gegenstand der vorgestellten Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkung von Hypoxie unter transienter HIF-1 $\alpha$ -Regulation auf die Proliferations- und Differenzierungs-Eigenschaften von hMSC. Das Untersuchungsmodell der Wahl ist hierfür ein 2-D Modell mit Kultivierung von hMSC unter definierten O<sub>2</sub> - Konzentrationen. Um die Zellen später sicher unter definierten O<sub>2</sub>-Bedingungen kultivieren zu können wurde zuerst der Verlauf der Sauerstoffkonzentrationen im Zellkulturmedium unter Atmosphären mit definiertem Sauerstoffgehalt (0%, 2%, 21%) untersucht. Hier stellte die Frage nach dem zeitlichen Verlauf der Sauerstoffkonzentration im Medium einen zentralen Aspekt dar. Im Anschluss erfolgte die *in vitro* Kultivierung von hMSC sowie SCP-1 und die Untersuchung ihrer Proliferationseigenschaften unter den wie oben definierten Sauerstoffkonzentrationen im Kulturmedium. Drittens wurde der zeitliche Verlauf der Expression von HIF-1 $\alpha$  in hMSC unter definierten Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Die jeweilige HIF-1 $\alpha$ -Konzentration und Expression wurde dabei auf mRNA- und Proteinebene dargestellt. Den vierten Punkt stellte die Regulation von HIF-1 $\alpha$  mit molekularbiologischen und pharmakologischen Mitteln dar. Hierbei wurde HIF-1 $\alpha$  mittels eines siRNA-Knock-Down-Verfahrens herunterreguliert und mittels des Eisenchelators Desferrioxamin (DFO) hochreguliert und in Normoxieatmosphäre stabilisiert. Im folgenden Schritt wurden die bisher gewonnenen Ergebnisse auf die osteogene Differenzierung von hMSC *in vitro* übertragen und das Differenzierungsverhalten von hMSC unter definierten Sauerstoffbedingungen sowie HIF-1 $\alpha$ -Expressionsniveaus untersucht.

## 2. Material und Methoden

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im Labor für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin (ExperiMed) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt, Klinikum der Universität München durchgeführt und nimmt im Rahmen dieser Studie aufgrund der zahlreichen verwendeten und etablierten Methoden eine wichtige Stellung ein.

### 2.1. Zellkultur und verwendete Zellen

Donor	hMSC lot Nummer	Alter	Geschlecht	Rassenzugehörigkeit
XIV	4F0760	25	weiblich	Kaukasisch
XV	6F3837	34	weiblich	Kaukasisch

**Tab. 1** Charakteristik der Stammzellspender

Für die Durchführung der Versuche wurden kommerziell erhältliche humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) der Firma Lonza verwendet. Diese wurden unter standardisierten Bedingungen mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Knochenmark gesunder Spender isoliert. Durch Überprüfung spezifischer Oberflächenmarker (positiv für CD105, CD166, CD29 und CD44 und negativ für CD14, CD34 und CD45) sowie Differenzierbarkeit in adipogene, chondrogene und osteogene Richtung wurde der Stammzellcharakter nachgewiesen ([www.lonzabioscience.com](http://www.lonzabioscience.com)). Damit entsprechen diese Zellen den Minimalanforderungen für mesenchymale Stammzellen (Dominici et al., 2006). Für alle Versuchsreihen wurden Zellen des gleichen Spenders (Donor XV) im gleichen Kultivierungsstadium (5. bis 8. Zellkulturpassage) verwendet.

Für einige Versuche wurde ein laboreigener Stamm immortalisierter hMSC, bezeichnet als SCP-1, verwendet (Böcker et al., 2008). Eine wichtige Eigenschaft der SCP-1 ist, dass sie etwas schneller proliferieren als die ursprünglichen hMSC des Donors XIV. Um die 70. Passage befanden sich die Zellen in der exponentiellen Phase ihres Wachstums und konnten osteogen, chondrogen und adipogen differenziert werden. SCP-1 führten bei subkutaner Implantation im Mausmodell in

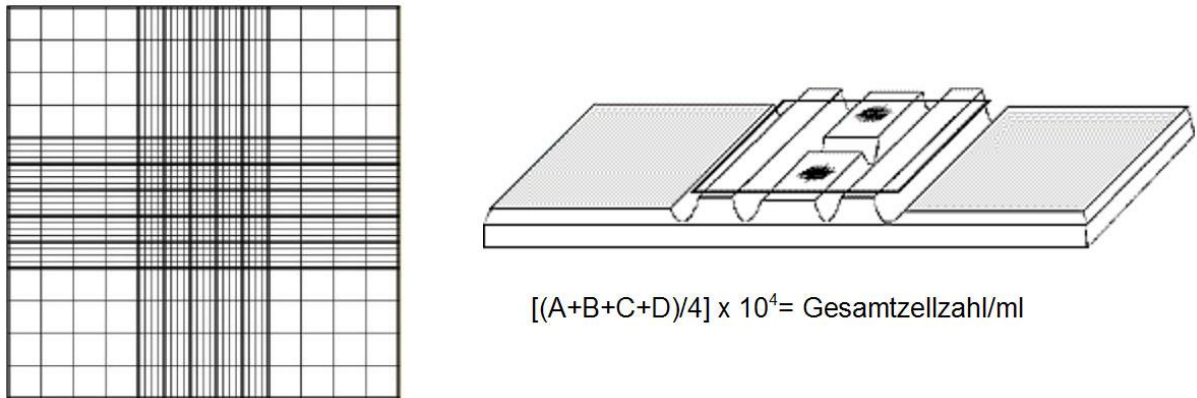
immundefizienten, athymen Mäusen nicht zu neoplastischer Entartung (Böcker et al., 2008).

## **2.2. *In vitro* Kulturbedingungen**

Für alle nachfolgenden Versuche wurden die Zellen zunächst als Monolayer in einem Inkubator bei 37° C, 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und expandiert. Das Kulturmedium *minimal essential medium alpha* ( $\alpha$ -MEM, Fa. Gibco) mit Glutamax I (Zusätze: Ribonukleotide, Desoxyribonukleotide) wurde mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) sowie 40 IU/ml Penicillin / Streptomycin versetzt. Zur Kultivierung wurden die Zellen in einer Konzentration von ca.  $0,2 \times 10^5$  je cm<sup>2</sup> Grundfläche in 225 cm<sup>2</sup> großen Kulturflaschen angesetzt.

## **2.3. Besiedelung, Passagierung und Konservierung der Zellen**

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 60% wurden die Zellen passagiert. Zunächst wurde das Kulturmedium aspiriert und die Zellen mit *phosphate buffered saline* (PBS) gespült um Medienrückstände auszuwaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1x Trypsin für etwa 5 Minuten bei 37°C trypsiniert. Trypsin löst die Zellen von der Oberfläche der Kulturschalen, indem die Serinprotease diejenigen Proteine spaltet, mit denen die Zellen an die Plastikoberfläche binden. Durch Zugabe der doppelten Menge an frischem Medium in die Kulturschalen wurde das Trypsin neutralisiert. Um eine Suspension von Einzelzellen zu erhalten, wurden die Zellen gründlich resuspendiert, und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Danach wurden die Zellen für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert, und der Überstand aspiriert, um das verbliebene Trypsin zu entfernen. Das Zellpellet wurde erneut mit frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von 2500 bis 6500 Zellen / cm<sup>2</sup> in neuen Kulturschalen ausplattiert, um am Folgetag eine Zellkonfluenz von 20% beziehungsweise 50% zu erhalten.



**Abb. 7** Neubauer Zählkammer

10µl der resuspendierten Zellsuspension wurde in eine der Kammern pipettiert. Die 4 äußeren Quadranten (A, B, C, D) wurden ausgezählt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass Zellen nicht mitgezählt wurden, die auf dem rechten oder oberen Rand der Quadranten lagen.

Die Anzahl der Zellen wurde mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt (Abb. 7) Nach der Trypsinierung wurden 10µl der resuspendierten Zellsuspension in eine der Kammern pipettiert. Die 4 äußeren Quadranten (A, B, C, D) wurden ausgezählt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass Zellen nicht mitgezählt wurden, die auf dem rechten oder oberen Rand der Quadranten lagen. Als Formel zur Ermittlung der Zellzahl/ ml diene:

$$[(A+B+C+D)/4] \times 10^4 = \text{Gesamtzellzahl/ml}$$

Um die Zellen zu konservieren, wurden sie zu je  $0,5 \times 10^6$  in Gefriermedium suspendiert, und in einem Cryovial tiefgefroren. Das Gefriermedium bestand aus 70% Kulturmedium, 20% fetalem Kälberserum (FKS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO ist ein wichtiger Bestandteil des Gefriermediums, da es die Eiskristallbildung und die damit verbundene Zellschädigung während des Gefriervorgangs verhindert. Die Cryovials wurden zunächst für 15 Minuten in Trockeneis schockgefroren und anschließend entweder bei  $-80^\circ\text{C}$  oder im Stickstoffbad zur dauerhaften Konservierung gelagert. Zur erneuten Nutzung wurden die Cryovials im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut, bis das Gefriermedium geschmolzen war. Sie wurden mit 2 ml frischem Medium in einem Zentrifugenröhrchen resuspendiert und für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert. Anschließend wurde der

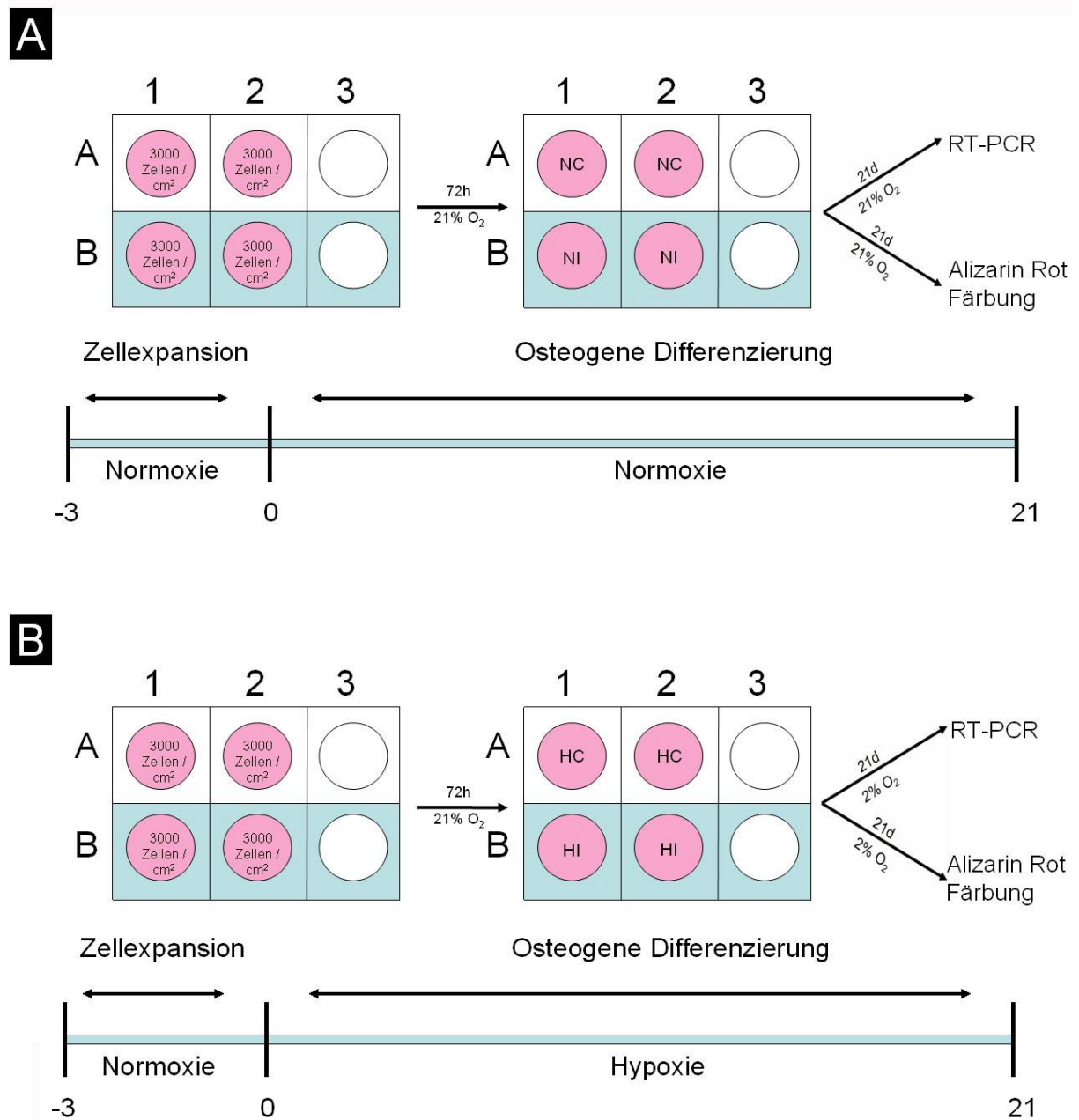
Überstand aspiriert, um das verbliebene Gefriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde erneut mit frischem, warmem Medium resuspendiert und in Kulturschalen ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt um nicht-haftende, also nicht-vitale Zellen zu entfernen.

## 2.4. Wachstumskinetik

Für jeden Zeitpunkt (1-16 Tage) wurden hMSC und SCP-1 jeweils als Duplikat mit einer Dichte von 500 Zellen / cm<sup>2</sup> in 6-well oder 12-well Kulturplatten ausplattiert. Zur Auswertung wurden sie trypsinisiert, abzentrifugiert und wie oben beschrieben, in der Neubauer Zählkammer ausgezählt.

## 2.5. Osteogene Differenzierung

Zur osteogenen Differenzierung wurden die hMSC (P6) aufgetaut und kultiviert wie oben beschrieben. Nach der Trypsinierung wurden sie in einer Dichte von 3000 Zellen / cm<sup>2</sup> in 6-well-plates (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) ausplattiert (Schieker et al., 2008). Die Zellen wurden unter Normoxiebedingungen bis zu 70-80%iger Konfluenz kultiviert. Diese Zelldichte wurde etwa 2-3 Tage nach Ausplattierung erreicht. Danach wurde jeweils in den unteren 3 der 6 Wells jeder Platte mit der osteogenen Differenzierung begonnen (Seitz et al., 2007). Hierzu wurde osteogenes Differenzierungsmedium hinzugefügt. Das Differenzierungsmedium bestand aus *DMEM high glucose medium* (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und wurde ergänzt mit 10% FKS, 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin, 100nM Dexamethason (Sigma, München, Deutschland), 10mM  $\beta$ -Glycerophosphat (Sigma, München, Deutschland) und 50 $\mu$ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (Sigma, München, Deutschland). Die verbliebenen 3 oberen Wells wurden als Negativkontrolle weiterhin mit normalem Vollmedium kultiviert. Mit Beginn der osteogenen Differenzierung wurden die Kulturschalen entweder bei Normoxie (21% O<sub>2</sub>) unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (Normoxische Proben; Abb. 8 A), oder bei hypoxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub>) in einer Niedrig-Sauerstoff-Atmosphäre, (Hypoxische Proben; Abb. 8 B) kultiviert. Alle 3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Um die erfolgreiche osteogene Stimulation nachzuweisen, erfolgte die Aufarbeitung der Proben in mehreren Arbeitsschritten, im Folgenden einzeln dargestellt werden.



**Abb. 8** Schema der osteogenen Differenzierung von hMSC

(A) Osteogene Differenzierung unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>)

(B) Osteogene Differenzierung unter Hypoxie (2% O<sub>2</sub>)

Zu Beginn wurden die Zellen für 3 Tage unter Normoxiebedingungen kultiviert. Dann wurde durch Zugabe des Differenzierungsmediums die osteogene Differenzierung induziert (blau unterlegt). Die induzierten Zellen wurden daraufhin für 21 Tage entweder unter Normoxie (A) oder Hypoxie (B) kultiviert. Abkürzungen: NI: Normoxie Induziert, NC: Normoxie Kontrolle, HI: Hypoxie Induziert, HC: Hypoxie Kontrolle.

## 2.6. Molekularbiologie

Zur Aufbereitung und Verarbeitung der RNA- und Proteinproben wurden folgende molekularbiologische Methoden verwendet.

### 2.6.1. mRNA-Isolierung

Die Isolierung und Reinigung von RNA aus den Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Venlo, Niederlande) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Lyse der adhärennten Zellen fand direkt auf den Trägermaterialien statt. Nach Abpipettieren des Zellkulturmediums und Waschen der Konstrukte mit PBS wurde der Lysepuffer hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Lysat zur Homogenisierung auf eine QiaShredder-Säule pipettiert und Spuren genomischer DNA wurden durch Verdau mit RNase-freien-DNase-Sets (Qiagen, Venlo, Niederlande) entfernt. Die Elution erfolgte in 30µl RNase-freien Wassers. Erfolgte die Weiterbearbeitung nicht unmittelbar im Anschluss, wurde die RNA für kurze Zeit (bis zu 4 Wochen) bei -20°C, beziehungsweise bei längeren Aufbewahrungszeiten bei -80°C gelagert.

### 2.6.2. cDNA-Synthese

Die reverse Transkription wurde mit der reversen Transkriptase des aviären Myeloblastosis-Virus (AMV) durchgeführt. Es wurde das Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis Kit<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. In diesem Kit sind Random-Hexamer-Primer bereits enthalten. Den Herstellerangaben folgend wurden die Reaktionen in einem PCR-Thermocycler durchgeführt (mit 50 minütiger Synthesephase bei 50°C). Für die Synthese der cDNA wurde 1µg RNA eingesetzt. Nicht unmittelbar für die PCR verwendete cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.6.3. Semiquantitative PCR-Analyse

Bei der semiquantitativen PCR-Analyse (*reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction*, rt-PCR) handelt es sich um eine Standardmethode zur Darstellung von Gen-Expressionsstärken nach der reversen Transkription (RT) von mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Nach einer definierten Anzahl von Zyklen wurden die Proben mit Fermentas 6x loading dye (#R0611XX, Fermentas, Burlington Canada) gefärbt, in die Taschen eines Ethidiumbromidgels aufgetragen und entlang



eines elektrischen Feldes ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt. Anhand der Stärke der im UV-Licht fluoreszierenden Banden im Ethidiumbromidgel kann man Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des jeweiligen Gens ziehen. Als Kontrolle wird parallel dazu die Bandenstärke eines sog. Housekeeping-Gens, wie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder  $\beta$ -Aktin zur Normierung verwendet.

#### 2.6.4. mRNA-Expressionsmusteranalyse

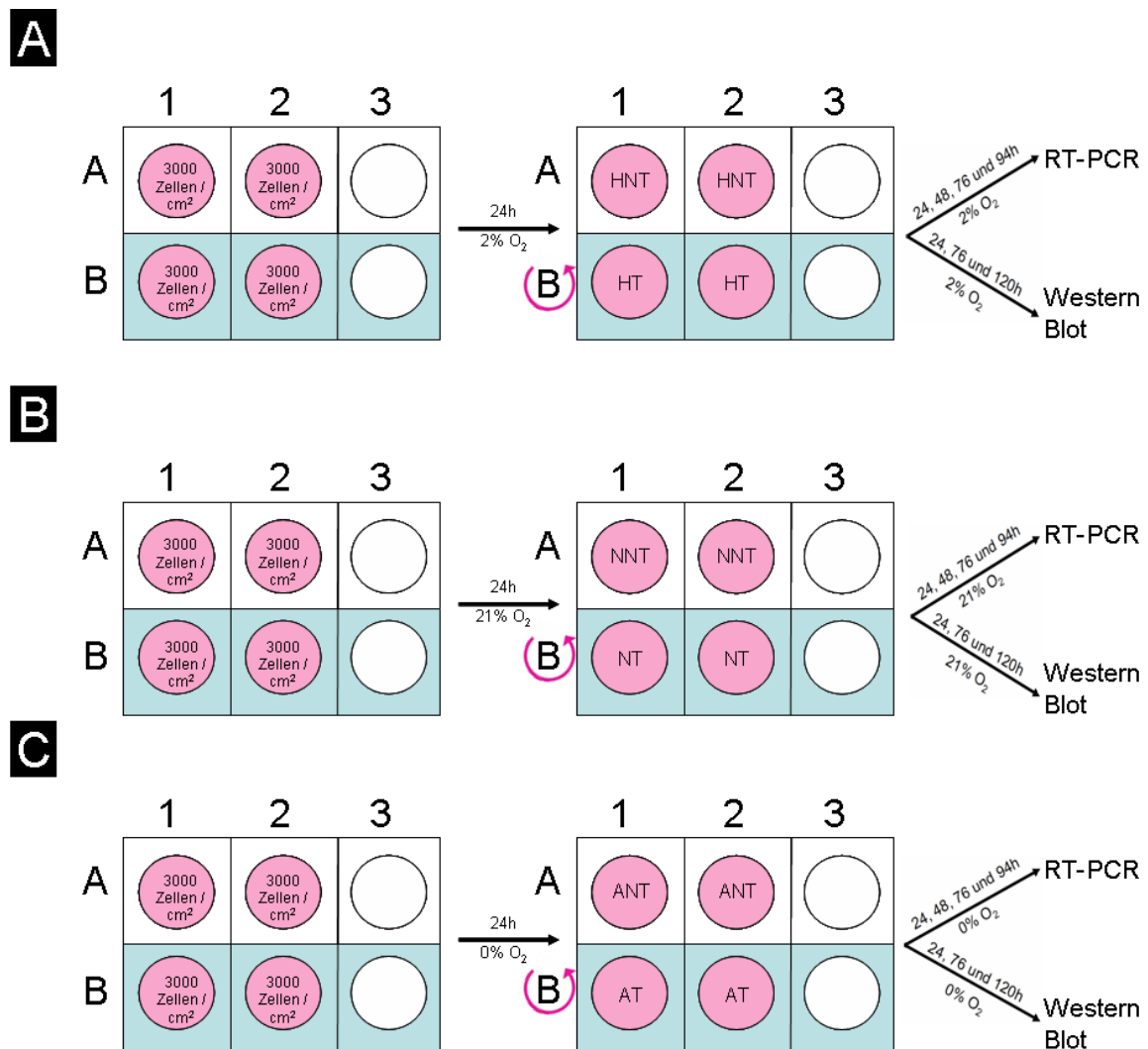
Um das zeitliche Expressionsmuster der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression während einer Hypoxieperiode zu untersuchen, wurden rt-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden alle 4 Stunden die mRNA von Zellen aus normoxischen, hypoxischen und anoxischen Proben isoliert. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy mini kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland). Anschließend wurde die reverse Transkription mit der reversen Transkriptase des aviären Myeloblastosis-Virus (AMV) durchgeführt. Es wurde das oben beschriebene Cloned AMV First Strand cDNA Synthesis Kit<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Um die mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$  im zeitlichen Verlauf zu erfassen, wurden folgende Primer verwendet:

HIF-1 $\alpha$ forward: 5'-GACAAGCCACCTGAGGAGAG-3'	}	(361bps)
HIF-1 $\alpha$ reverse: 5'-GGCCTTATCAAGATGCGAAC-3'		
GAPDH forward: 5'-CAACTACATGGTTTACATGTTC-3'	}	(181bps)
GAPDH reverse: 5'-GCCAGTGGACTCCACGAC-3'		
$\beta$ -Aktin forward: 5'-GCACTCTTCCAGCCTTCC-3'	}	(385bps)
$\beta$ -Aktin reverse: 5'-AGAAAGGGTGTAACGCAACTAAG-3'		
hVEGF forward: 5'-GCACCCATGGCAGAAGGAGG-3'	}	(263bps)
hVEGF reverse: 5'-CCTTGGTGAGGTTTGATCCGCATA-3'		

Die PCR-Produkte wurden auf Housekeeping-Gene (GAPDH,  $\beta$ -Aktin) normalisiert und in einem 1,5% Agarose Gel analysiert.

#### 2.6.5. siRNA-Knock-Down auf mRNA und Proteinebene

HMSC wurden mit HIF-1 $\alpha$ -siRNA (h):sc-35561 (SantaCruz, Kalifornien, USA) und Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad, USA) analog des Protokolls des Herstellers transfiziert. Hierzu wurden 3000 Zellen / cm<sup>2</sup> in 6-well-plates ausplattiert und über Nacht unter den jeweiligen Sauerstoffverhältnissen inkubiert (Abb. 9). Zur Transfektion wurden 100pmol der siRNA in 250 $\mu$ l Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) in Lösung gebracht. In einer weiteren Lösung wurden 5 $\mu$ l Lipofectamin ebenfalls mit 250 $\mu$ l Opti-MEM gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen gemischt und gemeinsam nochmals für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der siRNA-Oligomer-Lipofectamin-Komplex wurde daraufhin zu den Zellkulturschalen gegeben und unter den jeweiligen Sauerstoffverhältnissen für 5 Stunden inkubiert. Nach 5 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium gewechselt und durch normales Zellkulturmedium ersetzt. Nach 24, 48, 72, und 96 Stunden wurde die mRNA der Proben isoliert und die HIF-1 $\alpha$ -Expression mittels rt-PCR dokumentiert. Ebenso wurden nach jeweils 24, 72 und 120 Stunden die Proteine mittels Rapid-Protein-Extraktion isoliert, und unmittelbar anschließend im Western Blot auf die Expression von HIF-1 $\alpha$  überprüft.



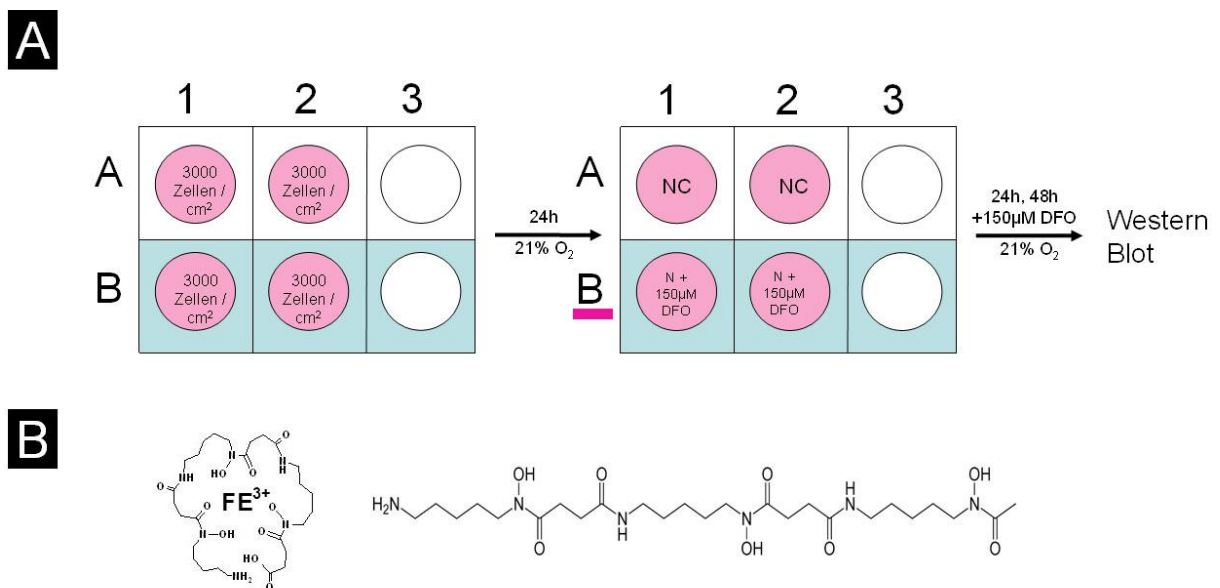
**Abb. 9** Schematischer Überblick über das siRNA Transfektionsexperiment.

- (A) HIF-1 $\alpha$  Transfektionsexperiment unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>)
- (B) HIF-1 $\alpha$  Transfektionsexperiment unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>)
- (C) HIF-1 $\alpha$  Transfektionsexperiment unter Anoxiebedingungen (0% O<sub>2</sub>)

Zu Beginn wurden 3000 Zellen /cm<sup>2</sup> in 6-well-dishes ausplattiert und für 24h je nach Teilversuch unter 0% O<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub> oder 21% O<sub>2</sub> weiter inkubiert. Danach wurden die Zellen mit HIF-1 $\alpha$ -siRNA transfiziert (blau unterlegt). Anschließend wurden die Zellen weiterhin für 4-5 Tage unter der jeweiligen Sauerstoffatmosphäre inkubiert. Nach jeweils 24, 48, 76 und 94 Stunden wurde die mRNA isoliert. In parallel kultivierten Proben wurden nach jeweils 24, 76, und 120 Stunden die Proteine isoliert und sofort mittels Western Blot für HIF-1 $\alpha$  analysiert. Abkürzungen: HT: Hypoxie Transfiziert, HNT: Hypoxie Nicht Transfiziert, NT: Normoxie Transfiziert, NNT: Normoxie Nicht Transfiziert, AT: Anoxie Transfiziert, ANT: Anoxie Nicht Transfiziert.

### 2.6.6. Desferrioxamin (DFO) Stabilisierungsversuch: HIF-1 $\alpha$ bei Normoxie

Zur Kultivierung der hMSC wurden dem Medium nach einem Tag Zellkultur unter Normoxiebedingungen 150 $\mu$ mol Desferrioxamin (DFO) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen weiter unter Normoxie kultiviert. Nach 24h und 48h wurden die Proteine mittels Rapid-Protein-Extraktion isoliert und jeweils auf die Anzahl der Zellen in den parallel ohne DFO gezüchteten Wells normalisiert. Mit den normierten Proteinextrakten von Proben und Kontrollen wurde sofort ein Western Blot für HIF-1 $\alpha$  durchgeführt. Als Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin (Abb.10 A). Der starke Eisenchelator Desferrioxamin entreißt hierbei den Prolylhydroxylasen ihr katalytisches Eisenion, da die Affinität der positiven Eisen(III)-Ionen für die negativen Partialladungen ( $\delta^-$ ) des DFO größer ist als die Bindungskräfte innerhalb der Hydroxylase. Infolge findet die Hydroxylierung der Prolylreste in der ODDD von HIF-1 $\alpha$  nicht statt und der anschließende proteasomale Abbau unterbleibt. HIF-1 $\alpha$  bleibt so auch bei Normoxie stabil und nachweisbar (Abb. 10 B).



**Abb. 10** Schematischer Überblick über das DFO Inkubationsexperiment.

(A) Schematischer Überblick über das DFO Inkubationsexperiment.

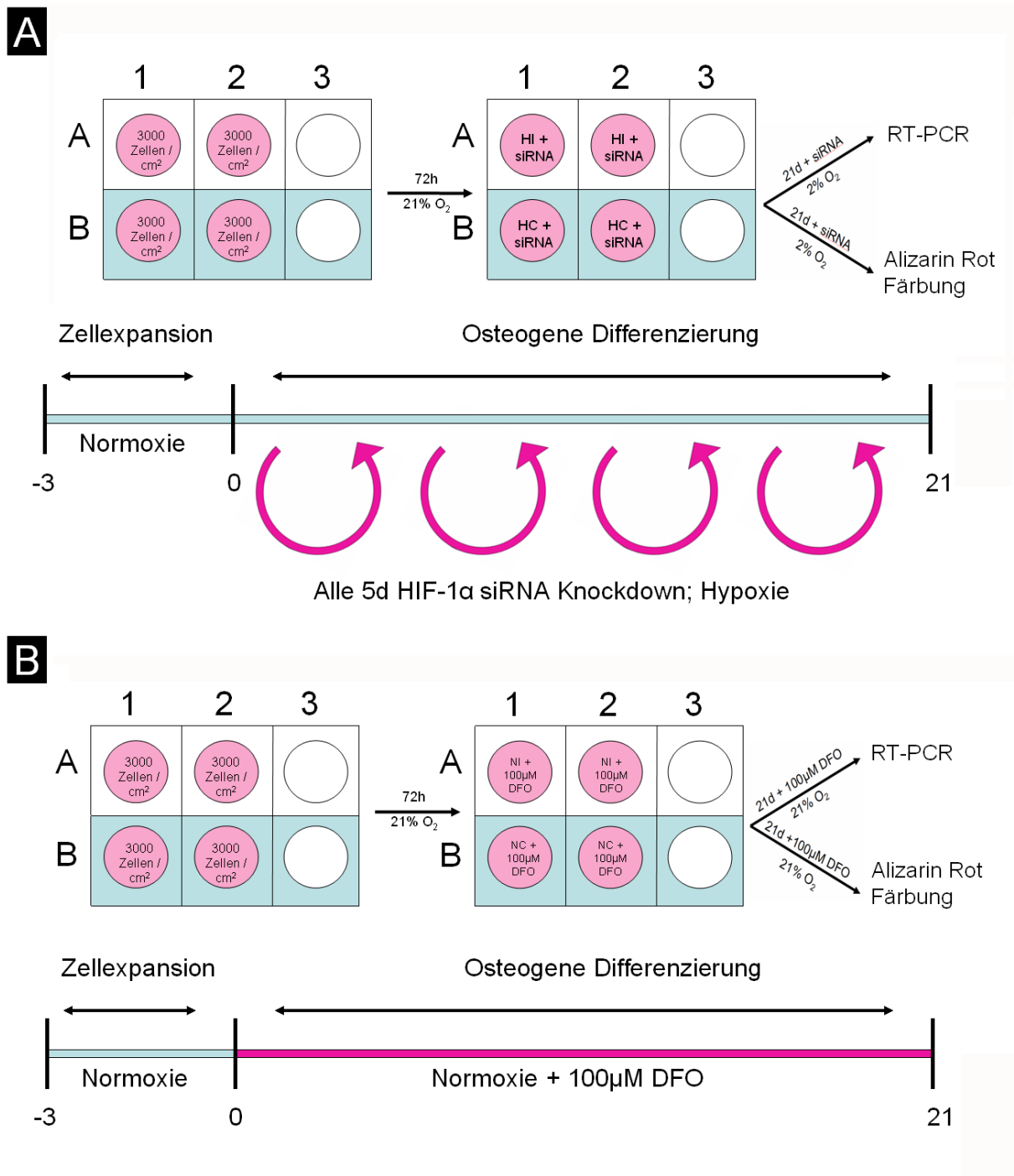
Zu Beginn wurden 3000 Zellen /cm<sup>2</sup> in 6-well-dishes ausplattiert und für 24h bei Normoxie inkubiert. Danach wurden dem Kulturmedium jeweils 150 $\mu$ mol DFO zugesetzt (blau unterlegt). Die Zellen wurden weiterhin unter Normoxie inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Proteine isoliert und sofort ein Western Blot für HIF-1 $\alpha$  durchgeführt.

(B) Desferrioxamin, C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>; Strukturformel und Chelator-Modell: Die positiven Ladungen von Eisen(III)-Ionen sind hochgradig affin für die negativen Teilladungen ( $\delta^-$ ) des DFO.

### 2.6.7. Wiederholter siRNA-Knock-Down und DFO Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ während der osteogenen Differenzierung

Um herauszufinden, ob HIF-1 $\alpha$  einen Effekt auf die osteogene Differenzierung besitzt, wurde in den Proben während der osteogenen Differenzierung wiederholt ein Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  mittels silencing-RNA (siRNA-Technik) durchgeführt.

Der selektive HIF-1 $\alpha$  Knock-Down wurde während der osteogenen Differenzierung insgesamt viermal, jeweils alle 5 Tage mittels siRNA durchgeführt (Abb. 11). Gleichzeitig wurden die Zellen für 21 Tage osteogen differenziert. Um HIF-1 $\alpha$  während der 21-tägigen Differenzierung unter Normoxiebedingungen zu stabilisieren wurde ebenfalls eine osteogene Differenzierung mit Zusatz von 100 $\mu$ M DFO durchgeführt. Am 21. Tag wurde in beiden Ansätzen das Ausmaß der Differenzierung mittels Alizarin-Rot-Färbung festgestellt.



**Abb. 11** Schema der HIF-1 $\alpha$  Regulation während der osteogenen Differenzierung

(A) Schematischer Überblick über das siRNA-Transfektionsexperiment bei simultaner, osteogener Differenzierung. Zu Beginn wurden 3000 Zellen /cm<sup>2</sup> in 6-well-dishes ausplattiert und für 72 Stunden unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit HIF-1 $\alpha$ -siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) weiter inkubiert und über 21 Tage osteogen differenziert. Die Transfektion wurde währenddessen insgesamt viermal, jeweils alle 5 Tage, wiederholt. Am 21. Tag wurde der Erfolg der Differenzierung mittels Alizarin-Rot-Färbung festgestellt.

(B) Schematischer Überblick über das DFO Inkubationsexperiment bei simultaner, osteogener Differenzierung. Zu Beginn wurden 3000 Zellen /cm<sup>2</sup> in 6-well-dishes ausplattiert und für 72 Stunden unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) inkubiert. Danach wurden dem Differenzierungs- und dem Kontrollmedium jeweils 100µmol DFO zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend weiterhin unter Normoxie inkubiert und über 21 Tage osteogen differenziert. Am 21. Tag wurde der Erfolg der Differenzierung mittels Alizarin-Rot-Färbung festgestellt.

## 2.6.8. Western Blot

### 2.6.8.1. Rapid Protein Extraktion

Nach Kultur unter Anoxie, Hypoxie, oder Normoxiebedingungen wurden mittels Rapid-Protein-Extraktion die Komplettlysate der Zellen gewonnen. Zunächst wurden die Zellen hierzu mit tief gekühltem PBS gewaschen und mit einer Mischung aus einfachem Lämmli-Puffer und 0,2 M Dithiothreitol (DTT) im Verhältnis 1:4 für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Scraper gelöst und das entstehende Zelllysate mittels Ultraschall homogenisiert. Danach wurden die Proteine für 5 Minuten bei 99°C denaturiert. Lysate die nicht sofort weiterverarbeitet wurden, wurden in Trockeneis tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Bevor die Zelllysate in das Gel eingebracht wurden, wurden sie bei 10.000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Menge der gewonnenen Zelllysate wurde auf die Anzahl der Zellen in einem parallel unter gleichen Bedingungen kultivierten Well normalisiert.

### 2.6.8.2. HIF-1 $\alpha$ -Western Blot

Zum direkten Nachweis von HIF-1 $\alpha$ -Protein wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierzu wurden nach Kultur unter Anoxie, Hypoxie, oder Normoxiebedingungen die Komplettlysate der Zellen mittels Rapid-Protein-Extraktion gewonnen. Nach der Normalisierung auf die Zellzahl wurden jeweils maximal 50µl der Proteinextrakte getrennt auf ein 8% Acrylamidgel geladen. Die Lysate wurden nach Proteingröße elektrophoretisch aufgetrennt, und auf eine Polyvinylfluoridmembran (PVDF, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Deutschland) geblottet. Hierzu wurde ein entsprechendes Gerät der Firma BioRad (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Die Membranen wurden in Tris-Pufferlösung mit 0,05% Tween-20 (TBST)

für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Magermilchprotein geblockt. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper anti-HIF-1 $\alpha$  (catalogue no. AB1536, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) in 1:1000 TBST-Lösung inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen gründlich mit TBST-Lösung gewaschen und mit dem *horseradish peroxidase-conjugated* (HRP-conjugated) Sekundärantikörper für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde die Membran erneut mit TBST-Lösung gewaschen. Die Proteinbanden wurden sichtbar gemacht, indem man zum gebundenen Sekundärantikörper das HRP-Substrat (Immobilon Western, Millipore, Schwalbach, Deutschland) zugebte. Dies führte zu einem chemilumineszenten Lichtsignal, das auf Röntgenfilm aufgezeichnet wurde. Um die gleichmäßige Beschickung mit Protein zu bestätigen, wurden die Membranen gestrippt und ein erneuter Western Blot für  $\beta$ -Aktin (catalogue no. sc-47778, Santa Cruz biotechnology, Heidelberg, Deutschland) in 1:4000 TBST-Lösung durchgeführt.

#### 2.6.9. Zellfraktionierung

Um Lysate der verschiedenen Zellkompartimente zu gewinnen, wurde der Qproteome™ Cell Compartment Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet und die Fraktionierung nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Nach Vorbereitung der Fraktionierungslösung und des Proteaseinhibitors, wurden die trypsinisierten und gewaschenen Zellen in einem frischen 2ml Mikrozentrifugenröhrchen mit 500 $\mu$ l CE1 Puffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert und auf einen QiaShredder übertragen. Anschließend wurden die Proben für 2 Minuten bei 4°C und 510g zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension wurde das Pellet in ein neues 2ml Mikrozentrifugenröhrchen übertragen. Zur Suspension wurden 500 $\mu$ l CE1 Puffer zugegeben und die Lösung für 10 Minuten bei 4°C in einem End-over-End Shaker inkubiert. Anschließend wurde das Lysat erneut für 10 Minuten bei 4°C und 4000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Röhrchen gefüllt und auf Eis gelagert. Der Überstand enthält die zytosolischen Proteine.

Das nun entstandene Pellet wurde erneut resuspendiert, mit 1ml eiskaltem CE2-Extraktionspuffer versetzt und für 30 Minuten bei 4°C in einem End-over-End Shaker inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten bei 4°C und 6000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein frisches Zentrifugenröhrchen



transferiert und auf Eis gelagert. In dieser Fraktion sind die Membranproteine enthalten.

Das nun entstandene Pellet wurde erneut resuspendiert, mit 13µl Aqua dest. und 7µl Benzoase versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500µl eiskalter CE3-Extraktionspuffer hinzugefügt und für 10 Minuten bei 4°C in einem End-over-End Shaker inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten bei 4°C und 6800g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, in ein frisches Zentrifugenröhrchen transferiert und auf Eis gelagert. Der nun entstandene Überstand enthält die Kernfraktion der Proteine.

## 2.7. Mikroskopie

Alle Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert S100 Mikroskop mit 75W Quecksilberlampe und den zugehörigen ZEISS Filtersets durchgeführt (CARL ZEISS, Jena, Deutschland). Die Photos wurden entweder mit einer Schwarz-Weiß Kamera AxioCam MRm, CARL ZEISS, Jena, Deutschland) oder einer passenden Farbkamera (ICC3, CARL ZEISS, Jena, Deutschland) aufgenommen und mit der zugehörigen Axiovision-Software verarbeitet (AxioVs40 V 4.5.0.0, CARL ZEISS, Jena, Deutschland).

### 2.7.1. Alizarin Rot Färbung

Nach einer 21-tägigen osteogenen Differenzierungsperiode unter Normoxie- oder Hypoxiebedingungen wurden die Proben mittels Alizarin-Rot-Färbung auf die Abscheidung kalzifizierter Matrix untersucht. Für die Färbung und die anschließende Quantifizierung der Kalzium-Deposition wurde der Osteogenesis-Quantitation Kit<sup>®</sup> (Millipore, Schwalbach, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 10% Paraformaldehydlösung fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und für 20 Minuten mit 40mM Alizarin-Rot-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssige Farbe auszuwaschen, wurden die Proben danach gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Die Aufnahmen wurden mit dem bereits erwähnten Zeiss Axiovert S100 Mikroskop abphotographiert. Die Quantifizierung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Das Ausmaß der osteogenen Differenzierung wurde photometrisch im *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

(ELISA) bestimmt. Hierzu wurde die Menge der Färbung in den Proben wieder in Lösung gebracht und mit einer standardisierten Alizarin-Rot-Verdünnungsreihe verglichen.

### 2.7.2. Pimonidazolfärbung

HMSC (P8) wurden mit einer Zelldichte von 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf Objektträgern ausplattiert und für 48 Stunden bei Normoxie oder Hypoxie inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200µmol in Medium gelösten Pimonidazol-Hydrochlorid behandelt, und für weitere 2 Stunden unter der jeweiligen Sauerstoffkonzentration inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert. Die Immunfärbung erfolgte analog zum Protokoll des Herstellers (Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 Plus Kit, Millipore, Schwalbach, Deutschland). Zur Immunfärbung wurde ein Fluorescein-Isocyanat-konjugierter Primärantikörper (*FITC-conjugated-mouse-monoclonal Antibody*) verwendet, der an Pimonidazol-Addukte bindet, die unter Hypoxiebedingungen entstehen. Die Nachweisgrenze für Hypoxie durch Pimonidazolfärbung liegt bei einem Sauerstoffpartialdruck von etwa 10 mmHg und darunter (Mowat et al., 2010), und wird demnach bei einer Sauerstoffkonzentration von 2% O<sub>2</sub> sicher erreicht. Zur Detektion wurde ein Anti-Maus-Antikörper mit Meerrettichperoxidase als Sekundärantikörper verwendet *mouse anti-FITC monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP)*.

## 2.8. Fluorimetrische Sauerstoffmessung

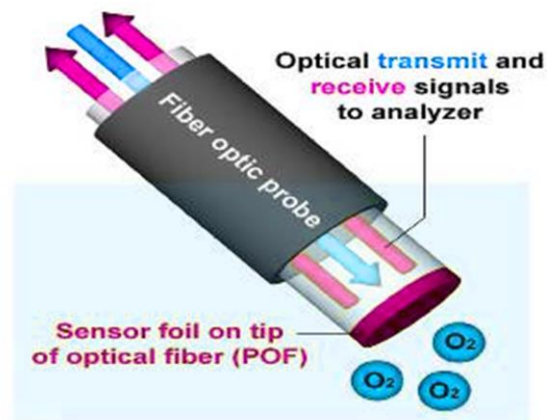
Das Prinzip der Sauerstoffmessung basiert auf der dynamischen Lumineszenzauslöschung (*dynamic luminescence quenching*) durch molekularen Sauerstoff. Ein Lichtimpuls bekannter Stärke wird in einem fiberoptischen Kabel zur Sensorfolie geschickt. Die Sensorfolie ist am Ende der Glasfaser aufgebracht und befindet sich jeweils innerhalb der Probe. Das blaue LED-Licht bringt die Sensorfolie zum Fluoreszieren. Treffen O<sub>2</sub>-Moleküle (Quencher) auf die Sensorfolie, so wird die durch LED induzierte Energie von der Folie ohne Lichtaussendung auf die O<sub>2</sub>-Moleküle übertragen. (Abb. 12) Dies führt zur Verminderung der gemessenen Fluoreszenz. Die Lumineszenz nimmt daher bei steigendem Sauerstoffgehalt ab. Das Ausmaß dieser Lumineszenzauslöschung korreliert mit dem Sauerstoffpartialdruck in der zu

messenden Probe. Die Beziehung zwischen der Sauerstoffkonzentration in der Probe und der Lumineszenzintensität wird in der Stern-Volmer-Gleichung beschrieben:

$$\frac{F_0}{F} - 1 = K_{SV} \cdot [Q] \quad \text{Stern-Volmer-Gleichung}$$

Dabei ist  $F_0$  die Fluoreszenzintensität des fluoreszierenden Farbstoffes in Abwesenheit des Quenchers,  $F$  die Fluoreszenzintensität desselben Farbstoffes in Anwesenheit des Quenchers,  $[Q]$  die Konzentration des Quenchers und  $K_{SV}$  die Stern-Volmer-Konstante.

$$\frac{F_0}{F} - 1 = K_{SV} \cdot [Q]$$



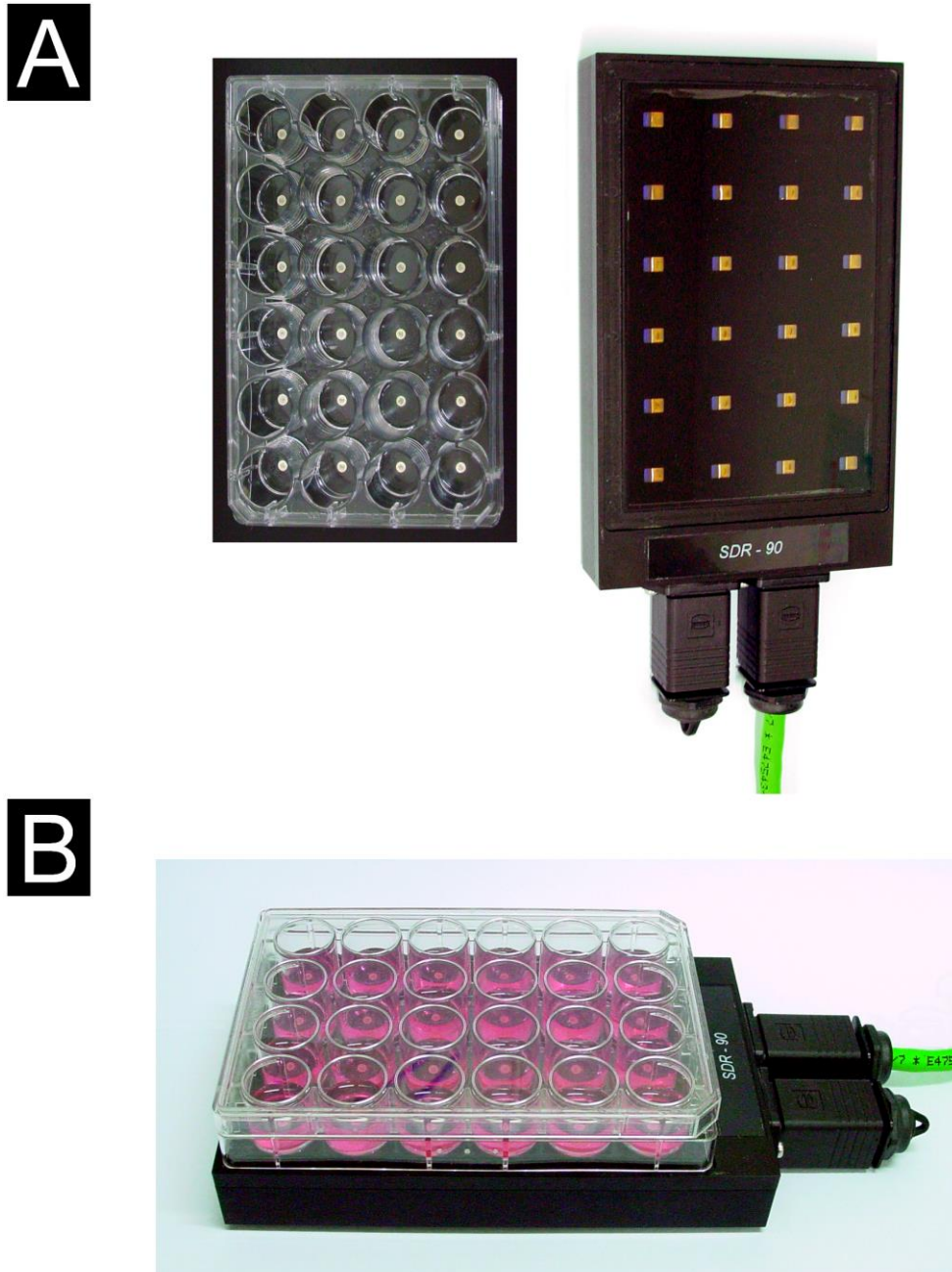
**Abb. 12** Schema der fluorimetrischen Sauerstoffmessung (*dynamic luminescence quenching*)

Blaues LED-Licht bringt die Sensorfolie zum Fluoreszieren. Treffen  $O_2$ -Moleküle (Quencher) auf die Sensorfolie, so wird die durch LED induzierte Energie von der Folie ohne Lichtaussendung auf die  $O_2$ -Moleküle übertragen. Dies führt zur Verminderung der gemessenen Fluoreszenz. Die Lumineszenz nimmt daher bei steigendem Sauerstoffgehalt ab. Das Ausmaß dieser Lumineszenzauslöschung korreliert mit dem Sauerstoffpartialdruck in der zu messenden Probe. In der Stern-Volmer Gleichung ist  $F_0$  dabei die Fluoreszenzintensität des fluoreszierenden Farbstoffes in Abwesenheit des Quenchers,  $F$  die Fluoreszenzintensität desselben Farbstoffes in Anwesenheit des Quenchers,  $[Q]$  die Konzentration des Quenchers und  $K_{SV}$  die Stern-Volmer-Konstante.

### 2.8.1. Sauerstoffmessung unter Hypoxie- und Normoxiebedingungen

In den Versuchen wurde der Sauerstoff mit dem SensorDish Reader (SDR, PreSens, Regensburg, Deutschland) gemessen. Die sterilen Polystyrene 24-well Multidishes enthalten je Well einen chemo-optischen  $O_2$ -Sensor, der den im Medium gelösten Sauerstoff misst (Abb. 13 A). Der Oxodish wurde auf den Dish-Reader (Abb. 13 B)

aufgebracht und im Inkubator aufgestellt. Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurde ähnlich wie bei Volkmer et al. (Volkmer et al., 2008) alle 30 Minuten die  $O_2$ -Konzentration im Medium gemessen. Zur besseren Darstellung wurden jeweils die Daten von 5 Stunden gepoolt und deren Standardabweichung berechnet.



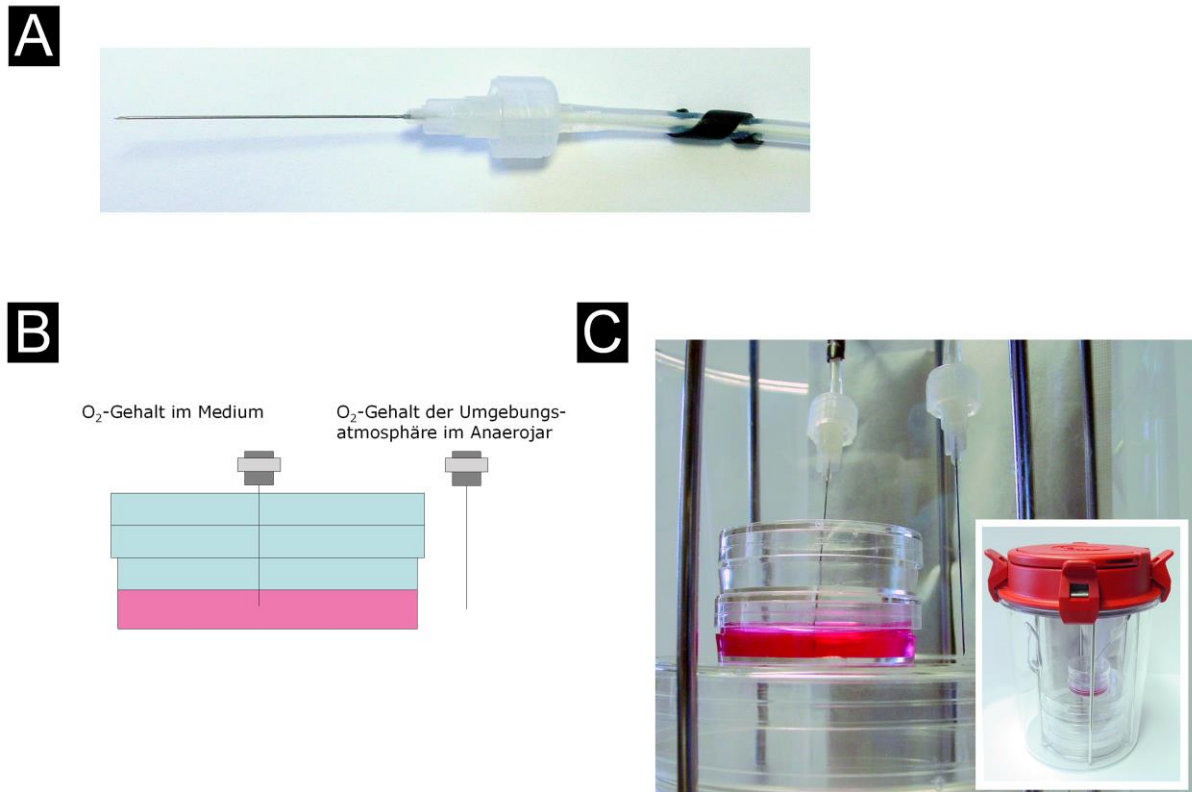
**Abb. 13** Sauerstoffmessgerät für Zellkultur unter Normoxie und Hypoxie.

(A) 24-well Kulturschale mit am Grund integrierten chemo-optischen Sensorfolien zur Messung des im Kulturmedium gelösten Sauerstoffs und Sensor-Dish-Reader SDR-90

(B) „OxoDish“ auf dem Lesegerät (SDR)

### 2.8.2. Sauerstoffmessung im Anaerojar

Im Anaerojar ist eine O<sub>2</sub>-Messung aufgrund der Größe und der zu gewährleistenden Dichtigkeit nur mit O<sub>2</sub>-Microsensoren vom Nadel-Typ möglich (PreSens, Regensburg, Deutschland). Die O<sub>2</sub>-Microsensoren besitzen eine sehr dünne und fragile Messspitze von nur 50µm Durchmesser. Dieser Microsensor befindet sich in einer Hohnadel von 0,4 mm Durchmesser (Abb. 14 A). So werden mechanische Schäden am Sensor vermieden, die beim Einbringen in die Messumgebung entstehen können. Die Sauerstoffsensoren wurden mit einem 2-Punkt-Verfahren kalibriert. 100% CO<sub>2</sub> entsprechen dabei 0% O<sub>2</sub>, die Umgebungsluft entspricht 21% O<sub>2</sub>. Um die Anoxiemessungen (Abb. 14 B, C) besser mit den Versuchen am OxoDish vergleichen zu können, wurde ebenfalls über einen Zeitraum von 4 Tagen, alle 30 Minuten die O<sub>2</sub>-Konzentration im Medium gemessen. Zur besseren Darstellung wurden jeweils die Daten von 5 Stunden gepoolt und deren Standardabweichung berechnet.



**Abb. 14** O<sub>2</sub>-Messung im Anaerojar

- (A) O<sub>2</sub>-Microsensor vom Nadel-Typ
- (B) Setup mit O<sub>2</sub>-Microsensor im Anaerojar (Schema)
- (C) Setup mit O<sub>2</sub>-Microsensor im Anaerojar (Photo); Inset: Anaerojar

## 2.9. Auswertmethoden

Alle Messwerte wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurde der unpaarige Student's t-Test verwendet. Als Signifikanzniveau diente ein p-Wert < 0,05. Alle Experimente wurden mindestens zweimal in voneinander unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

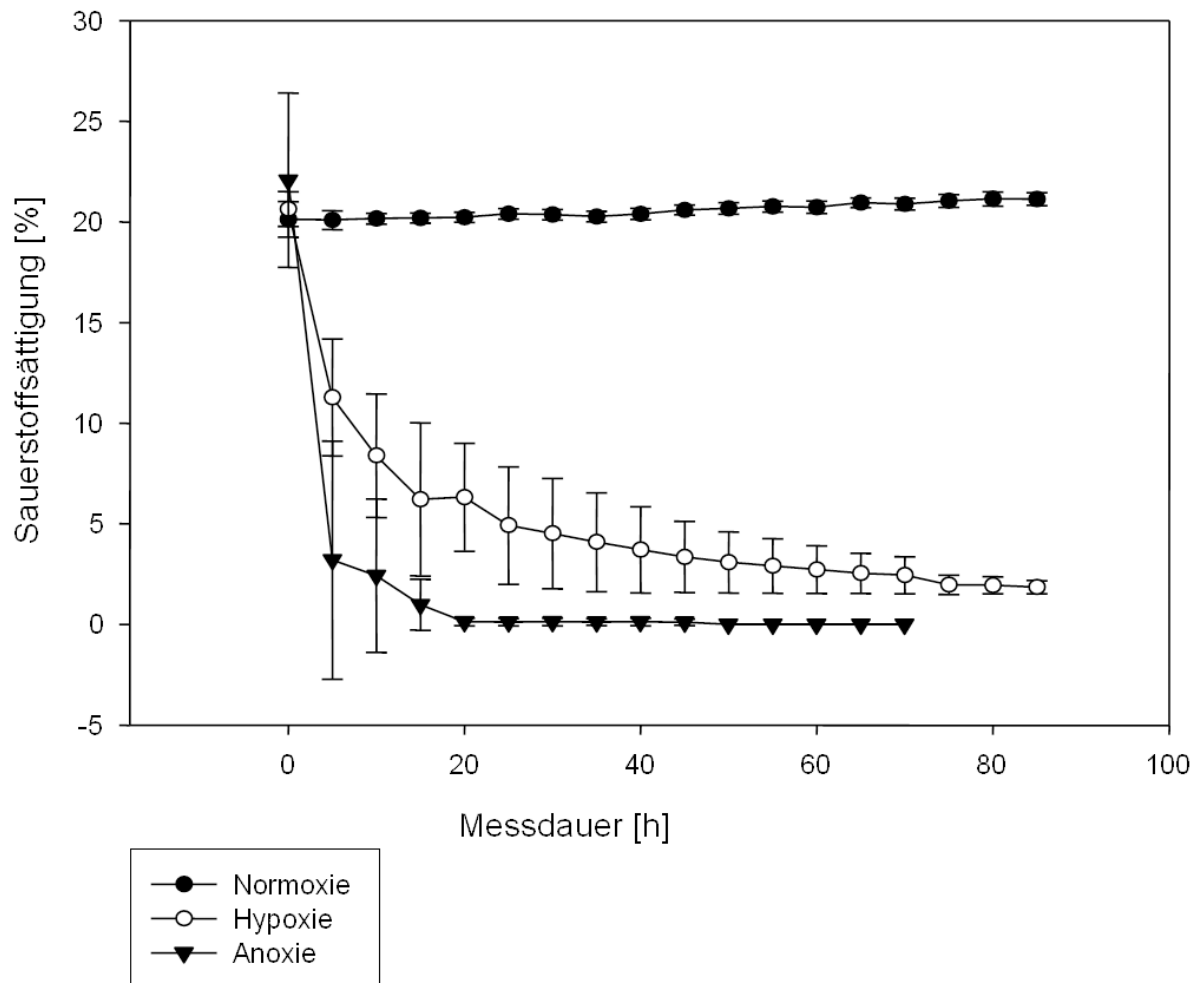
#### 3.1. Bestimmung der Sauerstoffverhältnisse im Kulturmedium

##### 3.1.1. Verlauf der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium unter Normoxie-, Hypoxie-, und Anoxiebedingungen

Will man Zellen unter definiert niedrigen Sauerstoffkonzentrationen kultivieren, so tritt insbesondere bei der kurzzeitigen Anwendung gering sauerstoffhaltiger Umgebungsatmosphären das Problem auf, dass sich die Sauerstoffkonzentration innerhalb des Kulturmediums erst an die umgebende atmosphärische Sauerstoffkonzentration angleichen muss. Während dieser Angleichungsphase herrschen im zu untersuchenden Medium relativ höhere Sauerstoffkonzentrationen. Die hierzu verwendeten Zellen sind während diesem Angleichungsprozess oft noch keinen hypoxischen Verhältnissen ausgesetzt. Um genau bestimmen zu können, dass die Zellen in den folgenden Versuchen tatsächlich für die festgelegte Zeit einem definiert niedrigen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt waren, war es für uns wichtig, den genauen Verlauf der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium zu untersuchen.

Im Zeitverlauf der Messung fiel die O<sub>2</sub>-Konzentration sowohl im Hypoxieinkubator, als auch im Anaerojar erwartungsgemäß bis zum jeweiligen Äquilibrium ab. Im Inkubator blieben die Sauerstoffkonzentrationen unter Normoxiebedingungen über die gesamte Zeit bei atmosphärischen 21% O<sub>2</sub>. Die Mittelwerte der Zeit bis zum Erreichen der O<sub>2</sub>-Referenzkonzentrationen von 10%, 5%, 2% und 0% unter Normoxie, Hypoxie und Anoxiebedingungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

## Verlauf der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium



**Abb. 15** Verlauf der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium unter Normoxie, Hypoxie und Anoxie

Die fluorimetrischen  $O_2$ -Messungen wurden über einen Zeitraum von bis zu 85 Stunden im 30 Minuten Takt durchgeführt. Zur besseren Darstellung wurden jeweils die Werte von 5 Stunden zusammengefasst dargestellt. Gezeigt wird jeweils der Mittelwert +/- zugehörige Standardabweichung. Normoxie wird als schwarze Punkte mit durchgezogener Linie dargestellt, Hypoxie als weiße Punkte, sowie Anoxie als schwarze Dreiecke. Die Ergebnisse basieren auf vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Es zeigte sich hierbei, dass die Sauerstoffkonzentration innerhalb des Zellkulturmediums ( $\alpha$ -MEM Glutamax + PenStrep) im Anaerobar am raschesten abfällt. Die mittlere Sauerstoffkonzentration von 5%  $O_2$ , die auch im Knochenmark vorliegt (Grayson et al., 2006), wurde im Anaerobar zum Teil bereits nach etwa 30 Minuten erreicht. Im Mittel dauerte es 1,5 Stunden bis eine Sauerstoffkonzentration



von 5% im Kulturmedium erreicht war. Anoxische Verhältnisse zwischen 0 und 0,2% O<sub>2</sub> wurden im Anaerobar zumeist nach 3 Stunden erreicht, wenn die Sauerstoffkonzentration auch im Medium abgefallen war (Abb. 15). Spätestens nach 17,5 Stunden herrschten im Medium immer anoxische Zustände von 0% O<sub>2</sub>. Im Hypoxieinkubator wurde eine sichere Sauerstoffkonzentration von 5% O<sub>2</sub> im Kulturmedium erst nach etwa 26 Stunden erreicht. Das Äquilibrium pendelte sich nach etwa 30 Stunden bei 2% O<sub>2</sub> ein. (Abb. 15) Die Bandbreite der Variabilität des Sauerstoffabfalls im Hypoxieinkubator ist jedoch ausgesprochen groß.

	21% O <sub>2</sub>	10% O <sub>2</sub>	5% O <sub>2</sub>	2% O <sub>2</sub>	0% O <sub>2</sub>
Normoxie 21% O <sub>2</sub>	dauerhaft	∅	∅	∅	∅
Hypoxie 2% O <sub>2</sub>	Startbedingung	8h	26h	30-69h	∅
Anoxie 0% O <sub>2</sub>	Startbedingung	0,5 h	1,5 h	11,5 h	(0,2%O <sub>2</sub> →3h) 17,5 h

**Tab. 2** Verlauf der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium (Mittelwerte)

## 3.2. Proliferationskinetik

### 3.2.1. Proliferationskinetik unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen

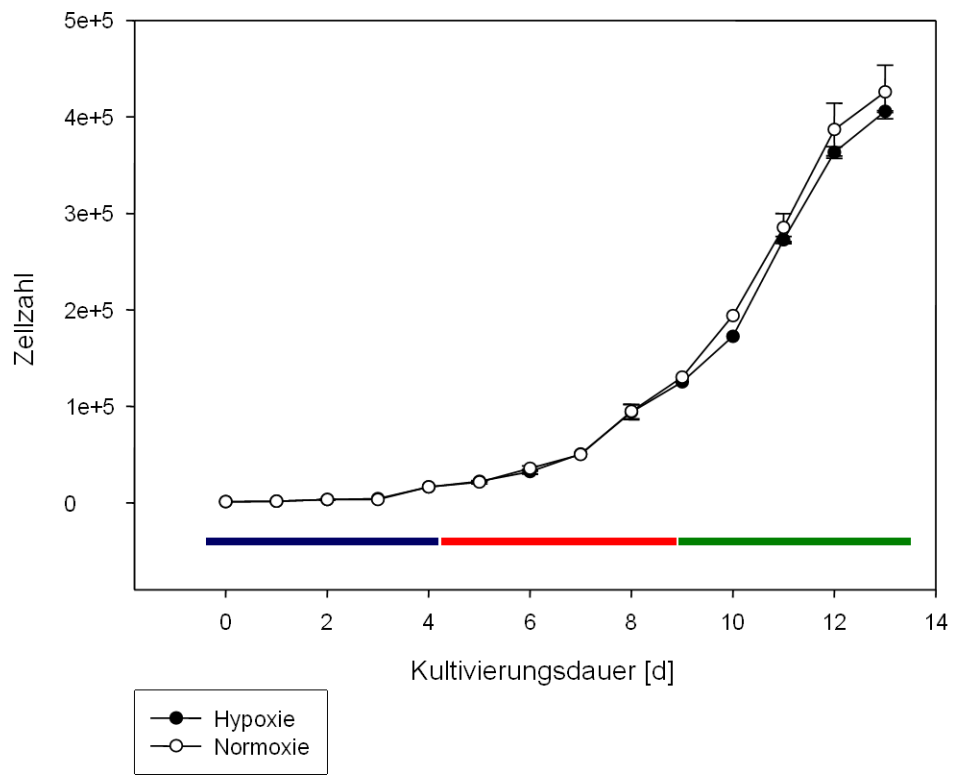
Um die Frage zu beantworten, ob die anliegende Sauerstoffkonzentration während der Zellkultur einen Einfluss auf Zellwachstum und Zellüberleben hat, wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) und SCP-1 unter definierten O<sub>2</sub>-Bedingungen inkubiert und deren Proliferationsverhalten unter Normoxie- (21% O<sub>2</sub>), Hypoxie- (2% O<sub>2</sub>), und Anoxiebedingungen (0% O<sub>2</sub>) untersucht. Hierzu wurden jeweils 1000 Zellen in 6-well-plates (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) ausplattiert, ihre weitere Proliferation beobachtet und jeweils im Abstand von 24 Stunden die Zellzahl ausgezählt. Es zeigte sich, dass wie bei den hMSC in den Vorversuchen auch die SCP-1 unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) keine Proliferationshemmungen aufwies. Die Proliferationskurven der untersuchten Zellen verliefen unter Hypoxie

und Normoxiebedingungen nahezu parallel. Signifikante Unterschiede hinsichtlich des Zellwachstums ließen sich nicht verzeichnen (Abb. 16 A).

Nach einer Lag-Phase von etwa 6 Tagen gingen die Zellen in die Phase logarithmischen Wachstums über. Die steigende Zelldichte im Laufe der Kultivierung führte sowohl unter Hypoxie-, als auch unter Normoxiebedingungen zum Anstieg der Populations-Verdopplungszeiten. Während die Verdopplungszeit in der Lag-Phase (blau unterlegt bis d4) noch bei etwa 24 Stunden lag, steigt sie während der Log-Phase (rot unterlegt d4 bis d9) bereits auf mehr als 40 Stunden an. Kurz vor dem Eintritt in die Plateauphase nach 13 Tagen Kultur im 6-well (grün unterlegt d9 bis d13) lag die Verdopplungszeit dann bei mehr als 120 Stunden (Abb. 16 B).

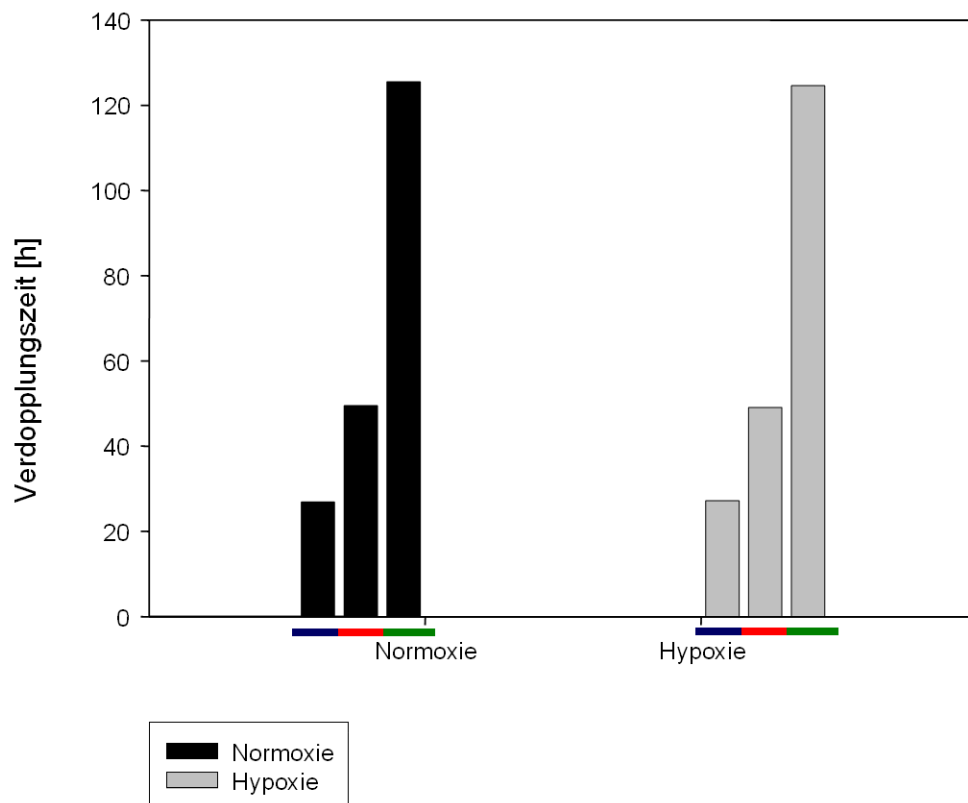
Proliferationskinetik Hypoxie vs. Normoxie

**A**



**B**

Entwicklung der Populationsverdopplungszeit



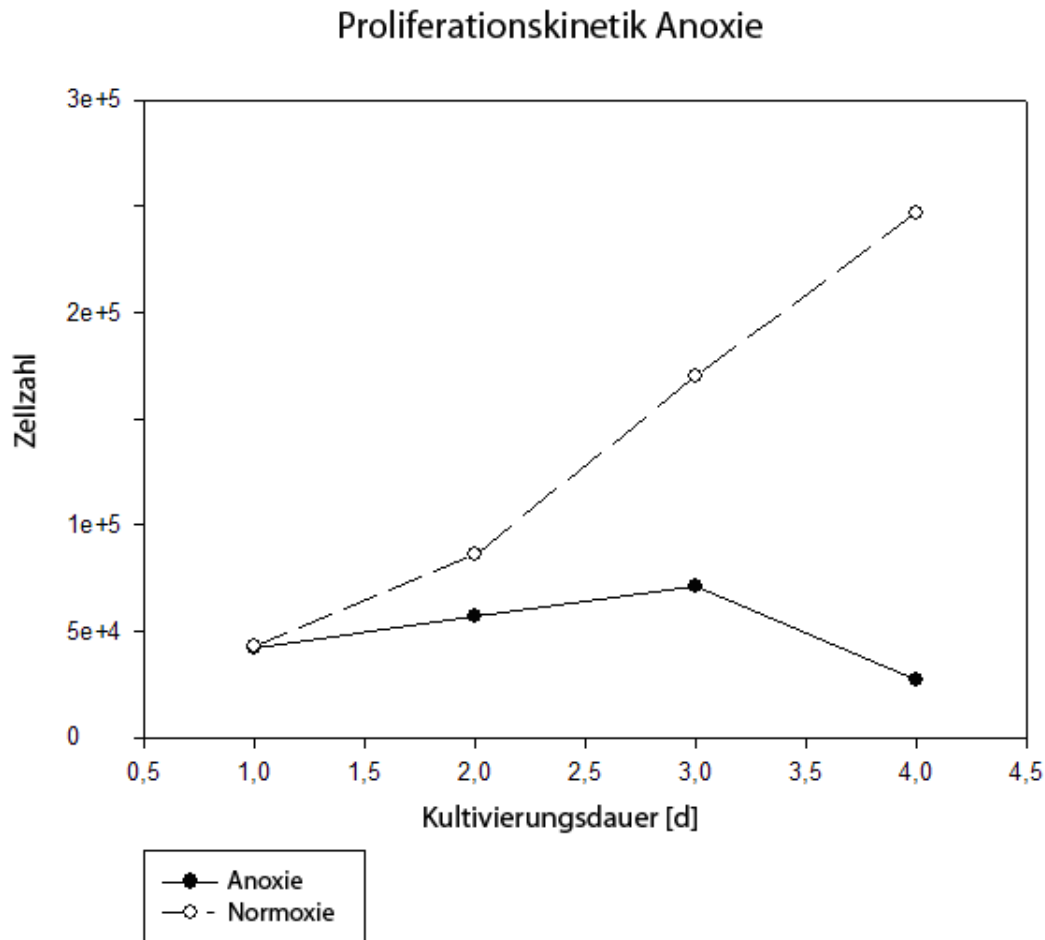
**Abb. 16** Proliferationskinetik unter Normoxie und Hypoxiebedingungen

Die Proliferation der Zellen unter Normoxie, Hypoxie und Anoxiebedingungen wurde durch das oben beschriebene Neubauer-Auszählverfahren bestimmt. Zu Beginn wurden jeweils 1000 Zellen (SCP-1) pro Well in 6-well-plates (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) ausplattiert. Die Kurven der Proliferationskinetik verliefen unter Hypoxie und Normoxiebedingungen nahezu parallel. Nach einer Lag-Phase von 6 Tagen gingen die Zellen in die Log-Phase über, um nach 13 Tagen Kultur im 6-well die Plateauphase zu erreichen (A). Die steigende Zelldichte im Laufe der Kultivierung führte sowohl unter Hypoxie-, als auch unter Normoxiebedingungen zum Anstieg der Verdopplungszeiten. Während die Verdopplungszeit in der Lag-Phase (blau unterlegt bis d4) noch bei etwa 24 Stunden lag, steigt sie während der Log-Phase (rot unterlegt d4 bis d9) bereits auf mehr als 40 Stunden an. Kurz vor dem Eintritt in die Plateauphase nach 13 Tagen Kultur im 6-well (grün unterlegt d9 bis d13) lag die Verdopplungszeit dann bei mehr als 120 Stunden (B).

Die Daten wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt, und jeweils in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert +/- die zugehörige Standardabweichung.

### 3.2.2. Proliferationskinetik unter Anoxiebedingungen

Zur Ermittlung der Proliferationskinetik unter Anoxiebedingungen wurden humane immortalisierte hMSC (SCP-1) im Anaerojar unter anoxischen Bedingungen kultiviert. Das Experiment zeigte, dass es unter Anoxiebedingungen bei SCP-1 Zellen nach einer minimalen Wachstumsphase spätestens nach 4 Tagen zum Absterben der Zellen kommt (Abb. 17). Vitale Zellen verblieben zu Beginn der anoxischen Kultivierungsphase zunächst noch adhärent und ließen sich im Phasenkontrastmikroskop scharf darstellen. Abgestorbenen Zellen imponierten hingegen als abgelöster Zellschrott.



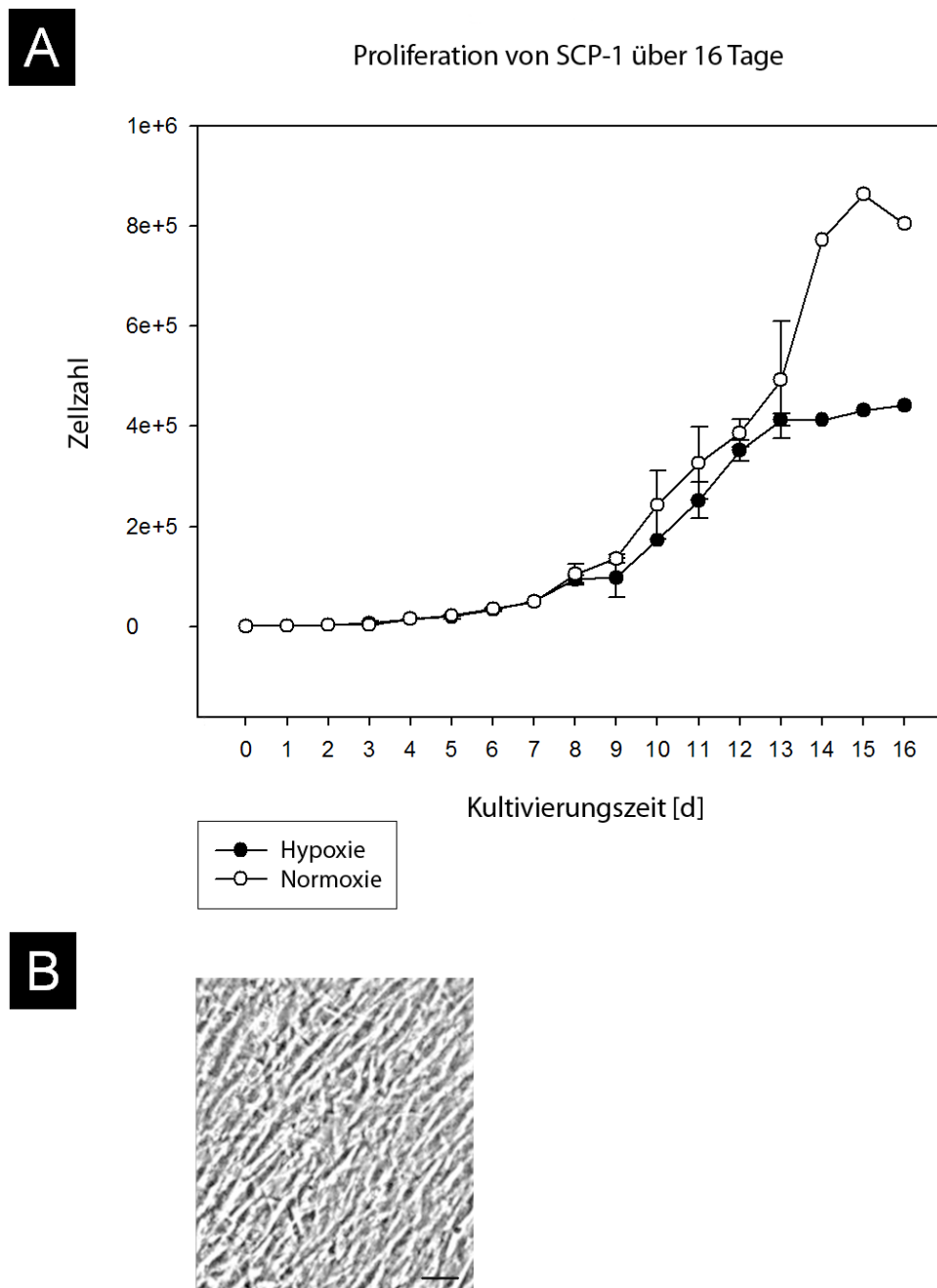
**Abb. 17** Proliferationskinetik unter Anoxiebedingungen

Unter Anoxiebedingungen kam es nach einer minimalen Wachstumsphase spätestens nach 4 Tagen zum Absterben aller Zellen. Noch vitale Zellen verblieben zunächst noch adhären und ließen sich im Phasenkontrastmikroskop scharf darstellen. Abgestorbenen Zellen imponierten hingegen als abgelöster Zellschrott. Es wurden SCP-1 der 77 Passage verwendet.

### 3.2.3. Proliferationskinetik von SCP-1 in 12-well-Kulturschalen

Bei Kultur von SCP-1 Zellen in 12-well-plates (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) verliefen die Wachstumskurven während der Lag- und Log-Phase unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) und hypoxischen (2% O<sub>2</sub>) Verhältnissen zu Beginn annähernd parallel. Während die Zellen unter Hypoxiebedingungen jedoch nach etwa 13 Tagen ihre Plateauphase erreichten, neigten die SCP-1 Zellen (Passage 77) unter Normoxiebedingungen dazu, multiple Zelllayer zu bilden und in mehreren Schichten übereinander weiterzuwachsen. (Abb. 18 A, B). Dieses Phänomen war

ausschließlich bei Kultur in 12-well-plates (NUNC, Wiesbaden, Deutschland) zu beobachten, und trat bei Kultur in 6-well-plates des gleichen Herstellers nicht auf.



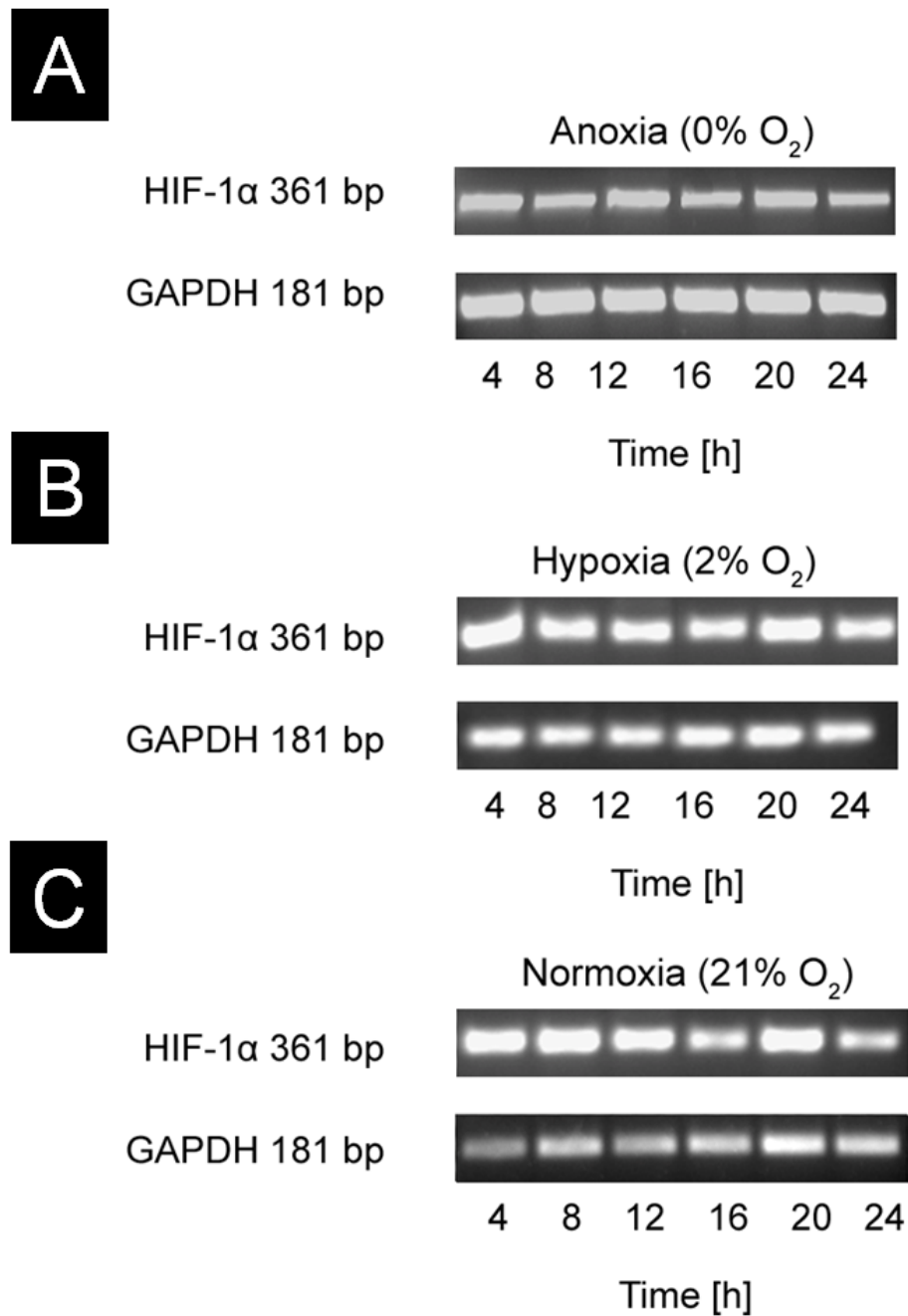
**Abb. 18** SCP wachsen im 12-well unter Normoxiebedingungen als Multilayer

(A) Wurden SCP-1 (Passage 77) über längere Zeiträume als 13 Tage unter Normoxiebedingungen in 12-wells kultiviert, so zeigte sich, dass diese Zellen sich anders als unter Hypoxiebedingungen nicht auf ihre Plateauphase einpendelten, sondern weiterhin ungehindert proliferierten. Hierbei bildeten sie im 2-D Kulturmodell im 12-well Multilayerstrukturen mit Zellwachstum in mehreren Schichten übereinander.

(B) SCP-1 Multilayer am Tag 15 bei Kultur unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) im 12-well, Phasenkontrastphotographie. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm.

### **3.3. Expression von HIF-1 $\alpha$ auf mRNA-Ebene**

HIF-1 $\alpha$  spielt eine wesentliche Rolle im Rahmen der Anpassung des Zellmetabolismus an das Überleben in einer hypoxischen Umgebung. Um ein genaueres Bild über das Expressionsmuster von HIF-1 $\alpha$  bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in hMSC zu erhalten, wurde die Expression von HIF-1 $\alpha$  in hMSC (Passage 7) unter definierten O<sub>2</sub>-Konzentrationen weiter untersucht. Zur Untersuchung der Expression von HIF-1 $\alpha$  wurde innerhalb einer Zeitreihe von insgesamt 24 Stunden die HIF-1 $\alpha$ -Messenger-RNA (mRNA) isoliert. Die mRNA-Isolation wurde jeweils alle 4 Stunden sowohl unter Anoxie- (Abb. 19 A), Hypoxie- (Abb. 19 B) als auch Normoxiebedingungen (Abb. 19 C) durchgeführt. Die isolierte HIF-1 $\alpha$ -mRNA wurde anschließend gegen GAPDH als Housekeeping-Gen aufgetragen und normalisiert.



**Abb. 19** Expression von HIF-1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene

Innerhalb einer Zeitreihe von insgesamt 24 Stunden wurde jeweils alle 4 Stunden unter (A) Anoxie-, (B) Hypoxie- und (C) Normoxiebedingungen die HIF-1 $\alpha$ - Messenger-RNA (mRNA) isoliert, und gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeping-Gen aufgetragen und normalisiert.

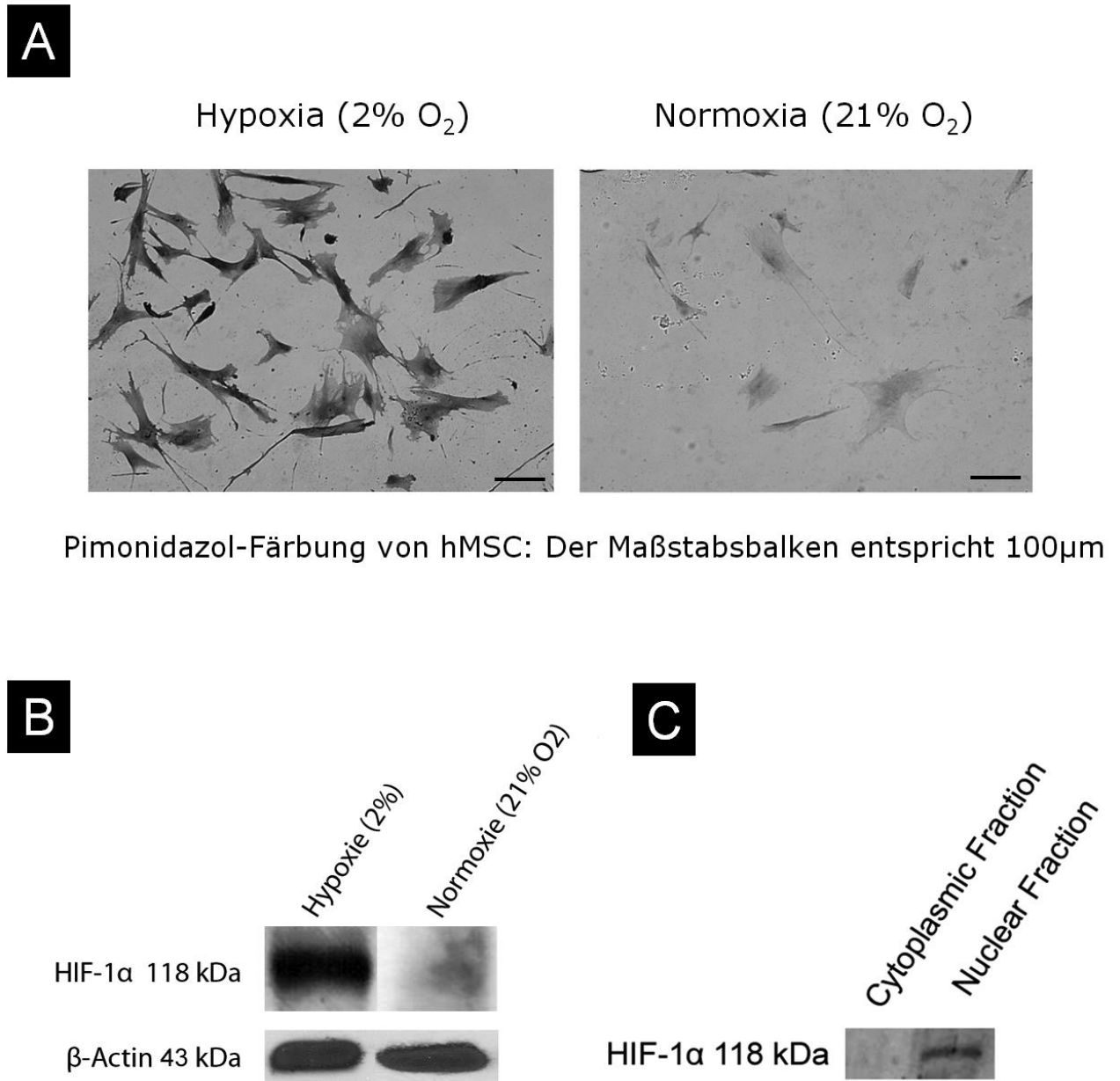
Die Expression von HIF-1 $\alpha$  ist auf mRNA-Ebene unabhängig von der anliegenden Sauerstoffkonzentration. Unter Anoxie- (0% O<sub>2</sub>), Hypoxie- (2% O<sub>2</sub>), und unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>), wird HIF-1 $\alpha$  mRNA gleichermaßen stark exprimiert. Die HIF-1 $\alpha$ -mRNA Expression ist zudem unabhängig von der Dauer des Sauerstoffentzugs.



Hierbei zeigte sich zum Einen, dass die Expression von HIF-1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene nicht von der anliegenden Sauerstoffkonzentration abhängig ist. Sowohl unter Anoxie- (0% O<sub>2</sub>) und Hypoxie- (0% O<sub>2</sub>), als auch unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>), wurde HIF-1 $\alpha$ -mRNA gleichermaßen stark exprimiert. Zusätzlich nimmt die HIF-1 $\alpha$  Expression nicht mit der Dauer der Sauerstoffverknappung zu. Die Expression von HIF-1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene ist also unabhängig vom Zeitpunkt der Messung, egal wie ausgeprägt und wie lange die Zellen bereits einer hypoxischen oder anoxischen Atmosphäre ausgesetzt waren. Dies bestätigt, dass es sich bei HIF-1 $\alpha$  um ein auf mRNA-Ebene kontinuierlich exprimiertes Gen handelt.

### 3.4. Nachweis zellulärer Hypoxie

Um nachzuweisen, dass die Zellen im Hypoxieinkubator hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, wurden die hMSC Zellproben 2 Stunden lang mit 200 $\mu$ M in Medium gelösten Pimonidazol-Hydrochlorid inkubiert. Unter Hypoxiebedingungen bildet Pimonidazol Addukte mit zellulären Proteinen, die sich nach der Fixierung mit 4% Paraformaldehydlösung in der Immunfärbung schwarz darstellen lassen. Anfärbbarkeit zeigte sich nur in den Proben, die im Hypoxieinkubator dauerhaft niedrigen Sauerstoffkonzentrationen von 2% O<sub>2</sub> ausgesetzt waren, nicht in den normoxischen Zellproben (Abb. 20 A). Um zu zeigen, dass die Zellen auch metabolisch auf den niedrigen O<sub>2</sub>-Spiegel reagierten, haben wir mittels Western-Blot untersucht, ob die hypoxischen Zellen *Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) exprimieren. HIF-1 $\alpha$  konnte hierbei auf Proteinebene nur in den hypoxischen Zellen dargestellt werden. In normoxischen Zellen ließ sich HIF-1 $\alpha$  nicht entsprechend darstellen (Abb. 20 B). Ferner konnten wir zeigen, dass HIF-1 $\alpha$ -Protein in den hypoxischen Zellen ausschließlich im Kernkompartiment nachweisbar war. (Abb. 20 C). HIF-1 $\alpha$ -Protein ließ sich nach der fraktionierten Proteingewinnung in den hypoxischen Zellproben ausschließlich im Kernkompartiment nachweisen. In der zytoplasmatischen Proteinfraction fand sich kein HIF-1 $\alpha$  im Western Blot.



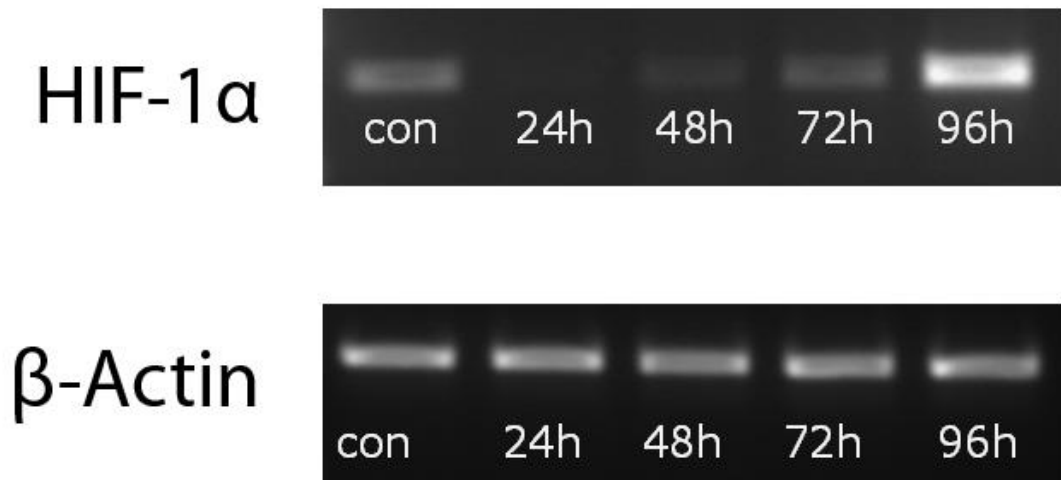
**Abb. 20** Nachweis zellulärer Hypoxie und HIF-1α als Transkriptionsfaktor im Zellkern

Die hMSC wurden zu diesem Experiment auf gläsernen Objektträgern entweder für 48 Stunden unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>), oder Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kultiviert. Anschließend wurde dem Kulturmedium 200µM Pimonidazol zugegeben und die Inkubation unter den vorherigen Bedingungen für weitere zwei Stunden fortgeführt. Schwarz angefärbte Zellen zeigen die Anwesenheit Hypoxie-sensibler Pimonidazol-Addukte. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 100µm (A). Die Western Blot Analysen bestätigten die Expression und Stabilisierung von HIF-1α in hypoxischen Zellen, sowie den Abbau von HIF-1α unter Normoxiebedingungen (B). Innerhalb der hypoxischen Zellen fand sich der Transkriptionsfaktor HIF-1α unter Hypoxiebedingungen nur im Kernkompartiment. Dies hängt mit seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zusammen. In der zytosolischen Proteinfraction ließ sich HIF-1α nicht nachweisen (C). Es handelt sich bei den Western Blot Analysen jeweils um die Extrakte von 50.000 Zellen.

### 3.5. Verfolgbarkeit und Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Knock-Downs auf mRNA-Ebene

Um die Hypothese zu prüfen, ob HIF-1 $\alpha$  ein direkter Inhibitor der osteogenen Differenzierung ist, sollte HIF-1 $\alpha$  während der osteogenen Differenzierung unter definierten Sauerstoffkonzentrationen regulierbar gemacht werden. Die Herabregulierung von HIF-1 $\alpha$  wurde hierbei mittels silencing-RNA Technik durchgeführt. Da ein solcher Knock-Down mit silencing-RNA nur einen zeitlich begrenzten Einfluss auf die Menge an gebildetem HIF-1 $\alpha$  - Protein hat, war es uns wichtig herauszufinden, wie lange der Effekt des HIF-1 $\alpha$ -Knock-Downs auf mRNA-Ebene nachweisbar bleibt. Hierzu wurde jeweils viermal im Abstand von je 24 Stunden nach dem Knock-Down die mRNA der hMSC isoliert. Währenddessen wurden die Zellen weiter unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kultiviert. Die isolierte HIF-1 $\alpha$ -mRNA wurde anschließend durch *polymerase chain reaction* (PCR) vervielfältigt und die Zeitreihe mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. HIF-1 $\alpha$  wurde anschließend gegen das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin normalisiert.

Mit der angewendeten HIF-1 $\alpha$ -silencing-RNA ließ sich nach 24 Stunden ein deutlicher Knock-Down auf mRNA-Ebene erzeugen. Auch 48 Stunden nach dem HIF-1 $\alpha$ -Knock-Down blieb die in der PCR sichtbare HIF-1 $\alpha$ -mRNA Menge eindeutig vermindert. Die gegenüber der Kontrolle unverminderte Menge an HIF-1 $\alpha$ -mRNA wurde im Experiment auch 72 Stunden nach dem HIF-1 $\alpha$ -Knock-Down noch nicht wieder voll erreicht. Nach 96 Stunden schien die Expression von HIF-1 $\alpha$  verstärkt stattzufinden (Abb. 21). Als Positivkontrolle diente die isolierte mRNA, aus Zellen, an denen bei Kultur unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kein Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  durchgeführt worden war.

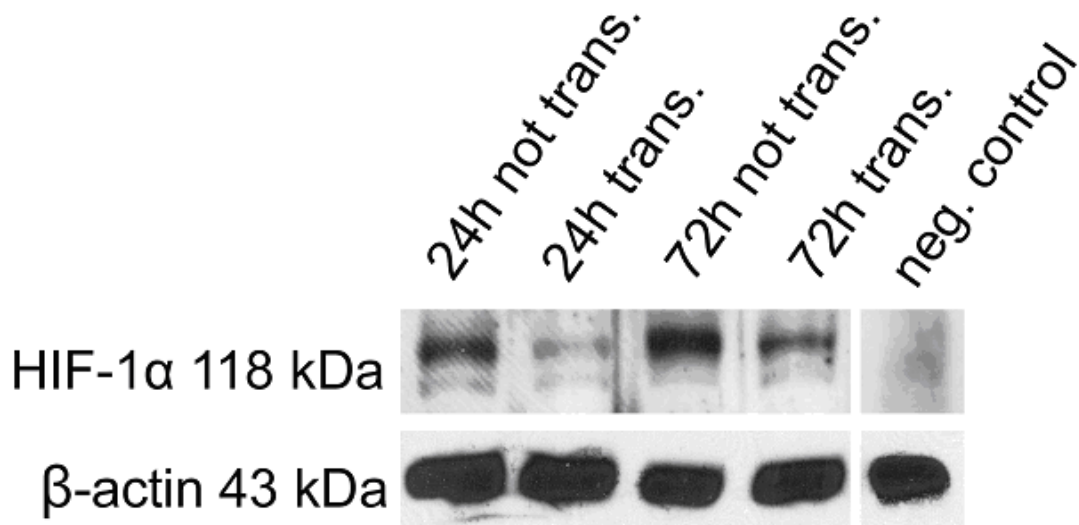


**Abb. 21** Nachweisbarkeit und Verfolgbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Knock-Downs auf mRNA-Ebene im Zeitverlauf unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen.

Die Herabregulierung von HIF-1 $\alpha$  bei Zellkultur unter definierten O<sub>2</sub>-Konzentrationen (Hypoxie 2% O<sub>2</sub>) wurde mittels silencing-RNA Technik durchgeführt. Anschließend wurde viermal im Abstand von je 24 Stunden die mRNA der hMSC isoliert und mit PCR-Methodik untersucht. Der zeitlich begrenzte Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  war auf mRNA Ebene über einen Zeitraum von 72 Stunden (3 Tagen) nachweisbar. Nach 24 Stunden ließ sich ein deutlicher HIF-1 $\alpha$ -Knock-Down feststellen. Auch nach 48 Stunden fanden sich noch deutlich verminderte Mengen von HIF-1 $\alpha$ -mRNA. Die gegenüber der Kontrolle unverminderte Menge an HIF-1 $\alpha$ -mRNA wurde auch nach etwa 72 Stunden noch nicht wieder voll erreicht. Nach 96 Stunden schien die Expression von HIF-1 $\alpha$  verstärkt stattzufinden.

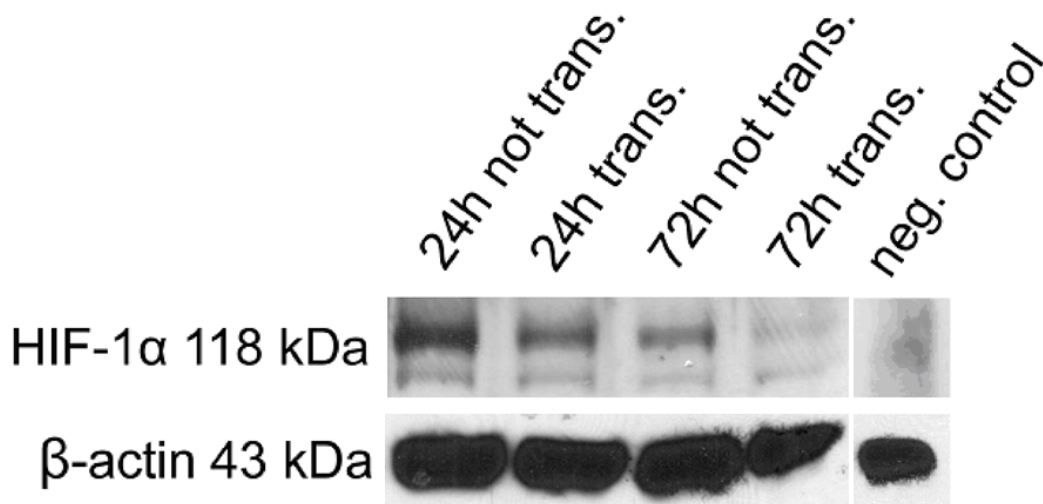
Als Positivkontrolle diente die isolierte mRNA, aus Zellen, an denen bei Kultur unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kein Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  durchgeführt worden war.

### 3.6. Verfolgbarkeit und Nachweisbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Knock-Downs auf Proteinebene



**Abb. 22** Nachweisbarkeit und Verfolgbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Knock-Downs auf Protein-Ebene im Zeitverlauf unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie 2% O<sub>2</sub>)

Die Herabregulierung von HIF-1 $\alpha$  bei Zellkultur unter definierten O<sub>2</sub>-Konzentrationen (Hypoxie 2% O<sub>2</sub>) wurde mittels silencing-RNA Technik durchgeführt. Um den Effekt auf Proteinebene zu untersuchen, wurde anschließend im Abstand von 24 und 72 Stunden die Gesamtproteinmenge der hMSC isoliert und mittels Western Blot untersucht. Der zeitlich begrenzte Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  war auf Proteinebene über einen Zeitraum von 72 Stunden (3 Tagen) nachweisbar. Nach 24 Stunden ließ sich ein deutlicher HIF-1 $\alpha$ -Knock-Down feststellen. Auch nach 72 Stunden fanden sich relativ zu den nicht transfizierten Proben noch verminderte Mengen von HIF-1 $\alpha$ -Protein. Als Positivkontrollen dienten die isolierten Gesamtproteine aus Zellen, an denen bei Kultur unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kein Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  durchgeführt worden war. Zur Negativkontrolle wurden Proteinisolate aus hMSC verwendet, die unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) kultiviert wurden. Es handelte sich jeweils um die Proteinextrakte von 50.000 Zellen.



**Abb. 23** Nachweisbarkeit und Verfolgbarkeit des HIF-1 $\alpha$ -Knock-Down auf Protein-Ebene im Zeitverlauf unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (Anoxie 0% O<sub>2</sub>)

Die Herabregulierung von HIF-1 $\alpha$  bei Zellkultur unter definierten O<sub>2</sub>-Konzentrationen (Anoxie 0% O<sub>2</sub>) wurde mittels silencing-RNA Technik durchgeführt. Um den Effekt auf Proteinebene zu untersuchen, wurde anschließend im Abstand von 24 und 72 Stunden die Gesamtproteinmenge der hMSC isoliert und mittels Western Blot untersucht. Analog zu den Versuchen unter Hypoxieatmosphäre war der zeitlich begrenzte Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  auf Proteinebene auch unter Anoxiebedingungen nachweisbar. Nach längeren Zeiträumen kam es unter Anoxiebedingungen zum Absterben aller Zellen (siehe hierzu auch Abb.17). Als Positivkontrollen dienten die isolierten Gesamtproteine aus Zellen, an denen bei Kultur unter Anoxiebedingungen (0% O<sub>2</sub>) kein Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  durchgeführt worden war. Zur Negativkontrolle wurden Proteinisolate aus hMSC verwendet, die unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) kultiviert wurden. Es handelte sich jeweils um die Proteinextrakte von 50.000 Zellen.

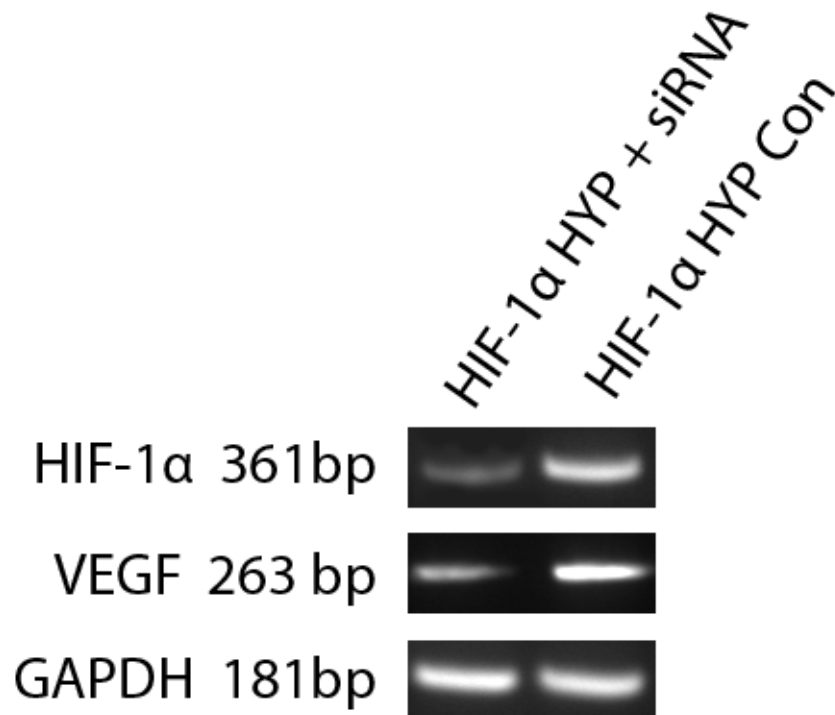
Vergleicht man die Bandenstärke von HIF-1 $\alpha$ -Protein mit den korrespondierenden Banden des Housekeeping-Gens  $\beta$ -Aktin, so ließ sich im Western Blot wie auch auf mRNA Niveau nach 24h ein deutlicher Knock-Down auf Protein-Ebene nachweisen. Obwohl die Menge an HIF-1 $\alpha$ -Protein nach 72 Stunden bereits wieder angestiegen war, blieb die Proteinmenge doch deutlich unter der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge der zugehörigen nicht transfizierten Zellproben. Der zeitliche Verlauf des Anstiegs der produzierten HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge (Abb. 22) verhielt sich hierbei analog zum Anstieg der HIF-1 $\alpha$ -mRNA auf mRNA Niveau (Abb. 21). Als Kontrolle dienten die isolierten Gesamtproteine jener Vergleichszellen, die unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) ohne Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  weiterkultiviert worden waren. Als Negativkontrolle dienten

die isolierten Proteine von Zellen, die unter Normoxiebedingungen kultiviert worden waren. In den Negativkontrollen, die unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) kultiviert worden waren, ließen sich keine Banden von HIF-1α-Protein nachweisen (Abb. 22, Abb. 23).

### **3.7. siRNA-Knock-Down von HIF-1α bewirkt Downregulation von VEGF auf mRNA Ebene**

Da HIF-1α ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Zellhomöostase bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ist, wollten wir nachweisen, dass die Herabregulierung von HIF-1α mittels silencing-RNA Technik auch einen Effekt auf die *Downstream-Targets* von HIF-1α, speziell den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) hat. Um nachzuweisen, dass sich der Knock-Down von HIF-1α mittels silencing-RNA-Technik auf die *Downstream-Targets* von HIF-1α auswirkt, wurden hMSC (Passage 7) für zwei Tage unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kultiviert. Anschließend wurde in den Proben ein HIF-1α-Knock-Down mit HIF-1α-silencing-RNA durchgeführt. Für die folgenden 24 Stunden wurden die Zellen weiter unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kultiviert (HIF-1α HYP+siRNA).

24 Stunden nach dem Knock-Down von HIF-1α wurde die mRNA isoliert mit PCR vervielfältigt und untersucht. Die PCR-Produkte von HIF-1α, und VEGF wurden hierzu elektrophoretisch aufgetrennt und gegen das Housekeeping-Gen GAPDH normalisiert. Als Kontrolle diente die mRNA, die aus Proben isoliert worden war, die parallel unter hypoxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub>) aber ohne Knock-Down von HIF-1α kultiviert worden waren (HIF-1α HYP Con). 24 Stunden nach dem Knock-Down von HIF-1α ließ sich sowohl bei der nachweisbaren Menge an HIF-1α-mRNA und infolgedessen auch bei der VEGF-mRNA, dem *Downstream-Target* von HIF-1α eine deutliche Verminderung feststellen. In den Kontrollen, die ohne HIF-1α-Knock-Down unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kultiviert wurden, zeigte sich in den PCR Untersuchungen eine deutlich stärkere VEGF-Bande und keine Verminderung der VEGF-Expression (Abb. 24).



**Abb. 24** Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  bewirkt Herabregulation von VEGF auf mRNA Ebene

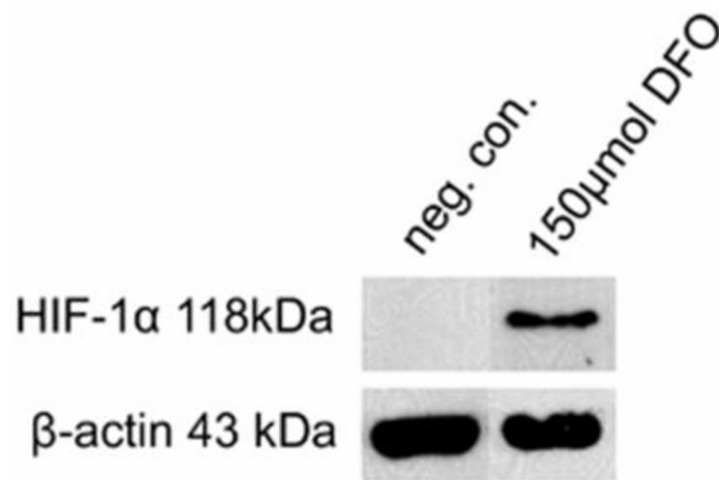
Der Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  mittels silencing-RNA-Technik wirkte sich auch auf die *Downstream-Targets* von HIF-1 $\alpha$  aus. Hierzu wurde in hMSC der Passage 7, 24h nach dem Knock-Down die mRNA aus den unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kultivierten Proben (HIF-1 $\alpha$  HYP+siRNA) isoliert und auf GAPDH normalisiert. Bei HIF-1 $\alpha$  und infolgedessen auch bei dessen *Downstream-Target-Gen* VEGF kam es zu einer Verminderung des Expressionsniveaus. Als Kontrolle diente die mRNA, die aus Proben isoliert wurde, die unter hypoxischen Bedingungen (2% O<sub>2</sub>) ohne Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  kultiviert worden waren (HIF-1 $\alpha$  HYP Con).

### 3.8. HIF-1 $\alpha$ -Hochregulation und Stabilisierung mittels

#### Desferrioxamin

Um zu prüfen, ob HIF-1 $\alpha$  als direkter Kofaktor an der osteogenen Differenzierung beteiligt ist, sollte HIF-1 $\alpha$  unter definierten Sauerstoffkonzentrationen regulierbar gemacht werden. Diese Regulierungsmethoden wurden anschließend auf die osteogene Differenzierung unter definierten Sauerstoffkonzentrationen übertragen. Die Herabregulierung von HIF-1 $\alpha$  wurde mittels HIF-1 $\alpha$  silencing-RNA auf RNA-Niveau durchgeführt. Zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  wurden hMSC (Passage 7) zunächst unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) kultiviert.





**Abb. 25** HIF-1α-Hochregulation und Stabilisation mittels Desferrioxamin ( $C_{25}H_{48}N_6O_8$ )

Mit dem Eisenchelator Desferrioxamin (DFO) konnte HIF-1α-Protein unter 21%  $O_2$  erfolgreich stabilisiert, infolge als Protein hochreguliert und im Western Blot auf Proteinebene nachgewiesen werden (150μmol DFO). Als Kontrolle diente eine Zellprobe die parallel ohne Zusatz von 150μmol DFO unter Normoxiebedingungen (21%  $O_2$ ) kultiviert worden war (neg. con.). Es handelte sich jeweils um die Proteinextrakte von 50.000 Zellen.

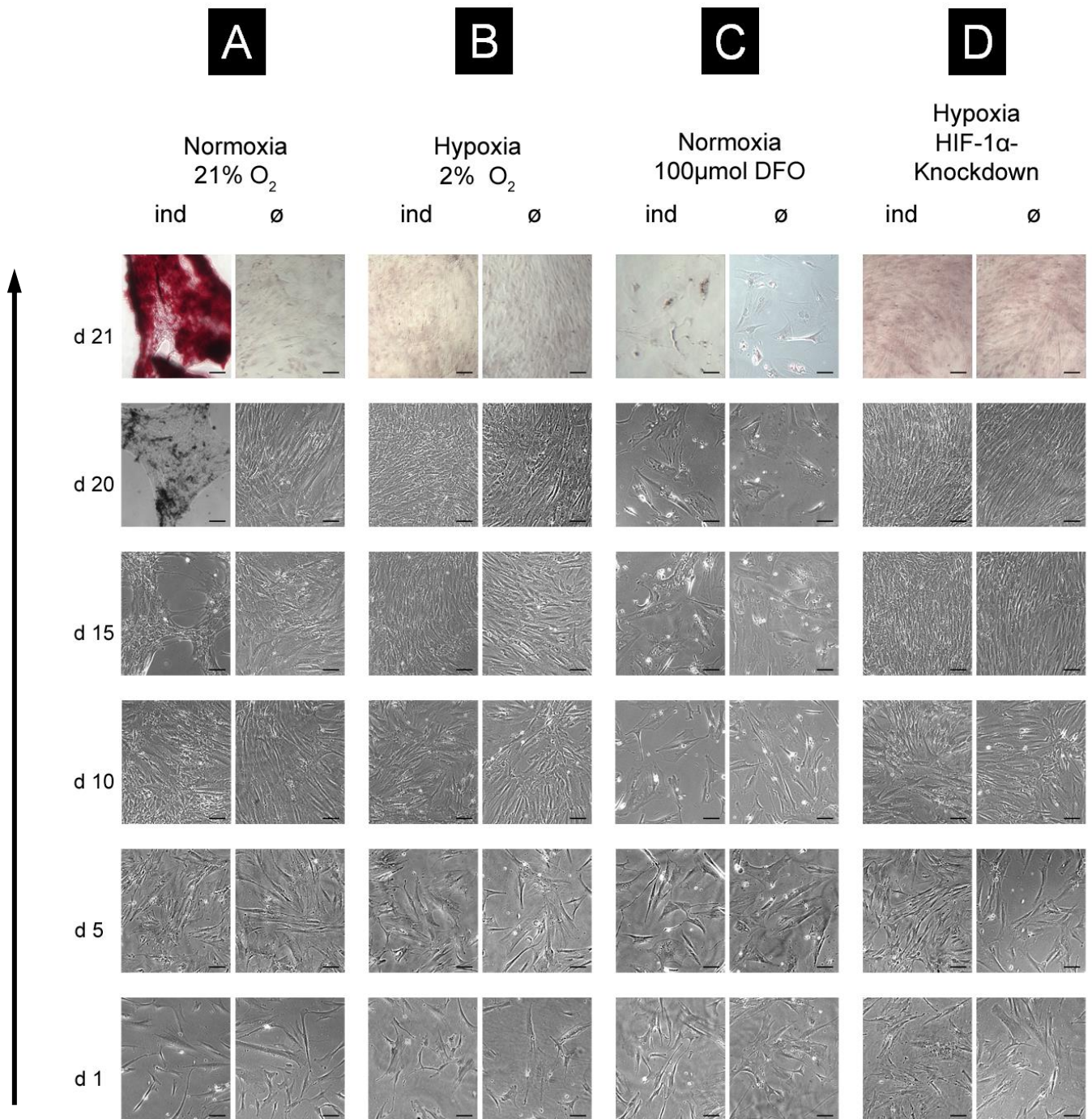
Dem Kulturmedium wurden 150μmol DFO zugesetzt und die Inkubation über 24h unter Normoxiebedingungen (21%  $O_2$ ) fortgeführt (150μmol DFO). Nach 24 Stunden wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse des Western Blots zeigten, dass HIF-1α durch Zugabe von 150μmol DFO auch unter Normoxiebedingungen (21%  $O_2$ ) auf Proteinebene darstellbar wird. In den Kontrollen (neg. con.), die ohne DFO unter Normoxiebedingungen (21%  $O_2$ ) kultiviert worden waren, war HIF-1α-Protein im Western Blot nicht nachweisbar (Abb. 25).

### 3.9. Osteogene Differenzierung von hMSC unter HIF-1α-Regulation

Wang et al. konnten zeigen, dass HIF-1α im Rahmen der Skelettentwicklung eine wichtige Rolle zukommt, da HIF-1α hier Angiogenese und Osteogenese *in vivo* miteinander verknüpft (Wang et al., 2007). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass HIF-1α die Knochenheilung beschleunigt (Wan et al., 2008). Auf dieser Grundlage lag die Hypothese nahe, dass HIF-1α eine Rolle innerhalb der osteogenen Differenzierung von hMSC unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen

zukommen könnte. Um diese These zu überprüfen wurde ein Experiment zur osteogenen Differenzierung von hMSC (Passage 6) durchgeführt. Die Zellen wurden unter definierten Sauerstoffkonzentrationen inkubiert und über 21 Tage osteogen differenziert. Zusätzlich wurden während der osteogenen Differenzierung die bereits beschriebenen Methoden zur Regulation von HIF-1 $\alpha$  angewendet. Je nach Ansatz wurde versucht HIF-1 $\alpha$  während der Differenzierungsperiode herauf- oder herunterzuregulieren. Die jeweils parallel durchgeführten Differenzierungsversuche umfassten vier Ansätze.

- 1.) Osteogene Differenzierung von hMSC unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>)
- 2.) Osteogene Differenzierung von hMSC unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>)
- 3.) Osteogene Differenzierung von hMSC unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) mit HIF-1 $\alpha$ -Hochregulierung durch 100 $\mu$ mol DFO
- 4.) Osteogene Differenzierung von hMSC unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) mit wiederholtem HIF-1 $\alpha$ -Knock-Down durch silencing-RNA



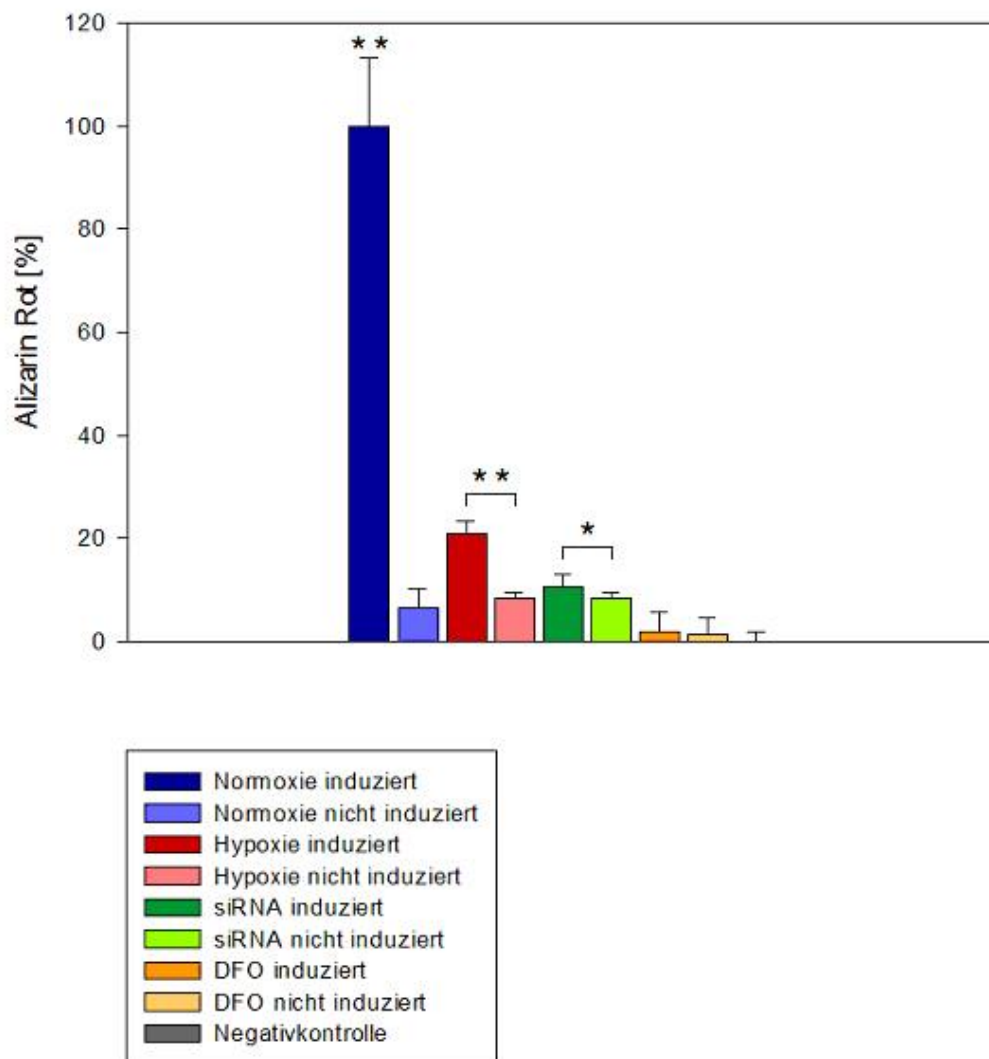
**Abb. 26** Osteogene Differenzierung von hMSC unter HIF-1 $\alpha$ -Regulation

An den Tagen 1, 5, 10, 15 und 20 der Differenzierung wurde das Wachstum der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert. HMSC, die unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) über 21 Tage osteogen differenziert wurden, zeigten ein hohes Ausmaß an Deposition extrazellulärer kalzifizierter Matrix. Diese ließ sich mittels Alizarin-Rot-Färbung stark anfärben (A). Zellen die unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) kultiviert wurden, zeigten keine vergleichbare Anfärbbarkeit mit Alizarin-Rot (B). Zellen, die unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) mit 100µmol Desferrioxamin (DFO) zur HIF-1 $\alpha$ -Hochregulierung behandelt wurden, zeigten erhöhte Absterberaten bei der über die lange Einwirkungsdauer von 21 Tagen bestehenden Toxizität des DFO. Eine durch Alizarin-Rot anfärbbare

Differenzierung ließ sich nicht nachweisen (C). Der viermal wiederholte Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  in hMSC hatte keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen. Eine osteogene Differenzierung in Form von Alizarin-Rot anfärbbarer Matrix blieb jedoch aus (D). Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 100 $\mu$ m.

An den Tagen 1, 5, 10, 15 und 20 der Differenzierung wurde das Wachstum der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie dokumentiert. Am 21. Tag der osteogenen Differenzierung wurde das Ausmaß der Matrixdeposition erneut mikroskopisch dokumentiert und mittels Alizarin-Rot-Färbung quantifiziert. Als Kontrollen dienten jeweils gleich behandelte nicht osteogen differenzierte Zellproben ( $\emptyset$ ).

## Quantifizierung der extrazellulären Matrixdeposition mittels Alizarin Rot Färbung



**Abb. 27** Quantifizierung der extrazellulären Matrixdeposition mittels Alizarin-Rot-Färbung

Die photometrische Untersuchung der mit Alizarin-Rot gefärbten Zellproben diente der Quantifizierung der extrazellulär abgelagerten Matrix. Abgebildet ist jeweils der normierte Mittelwert als Prozentangabe plus die zugehörige Standardabweichung. Wie nach dem mikroskopischen Befund zu erwarten, zeigte sich bei der photometrischen Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung der unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>) osteogen induzierten Zellproben eine stark signifikante Erhöhung gegenüber allen anderen Differenzierungsansätzen ( $p \leq 4,0 \times 10^{-7}$ ). Die übrigen induzierten Proben zeigten nur im Hypoxie- ( $p = 5,4 \times 10^{-5}$ ) und siRNA-Ansatz ( $p = 0,012$ ) signifikant erhöhte Werte gegenüber den jeweiligen nichtinduzierten Proben. Verglichen mit den quantitativen Ergebnissen der erfolgreichen Differenzierung unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) erwiesen sich die Werte der induzierten Proben im Hypoxie- oder siRNA-Ansatz jedoch als vernachlässigbar klein. Innerhalb des DFO-Ansatzes zeigte sich keine signifikant unterschiedliche Alizarin-Rot-Färbung ( $p = 0,631$ ). Als Negativkontrolle wurde Aqua dest. verwendet.

**Absolutwerte:**

Normoxie induziert: 227,4 $\mu$ M, SD 13,0 / Normoxie nicht induziert: 35,9 $\mu$ M, SD 3,9  
Hypoxie induziert: 65,3 $\mu$ M, SD 4,7 / Hypoxie nicht induziert: 39,1 $\mu$ M, SD 2,2  
Hypoxie - siRNA induziert: 44,6 $\mu$ M, SD 2,4 / Hypoxie- siRNA nicht induziert: 39,9 $\mu$ M, SD 1,0  
Normoxie - DFO induziert: 26,7 $\mu$ M, SD 3,9 / Normoxie - DFO nicht induziert: 25,4 $\mu$ M, SD 3,3

Das Experiment zeigte, dass sich die hMSC unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) gut in osteogener Linie differenzieren ließen. Der deutliche Differenzierungserfolg schlug sich in einer ausgeprägten Alizarin-Rot-Färbung nieder (Normoxie induziert: 227,4 $\mu$ M, SD 13,0 / Normoxie nicht induziert: 35,9 $\mu$ M, SD 3,9) (Abb. 26 A). Auch in der photometrischen Quantifizierung der unter Normoxie induzierten Proben ließ sich ein signifikantes Maß ( $p \leq 4,0 \times 10^{-7}$ ) an Alizarin-Rot-Färbung gegenüber allen anderen Differenzierungsansätzen darstellen (Abb. 27). Obgleich der quantitative Test innerhalb der hypoxischen Proben (2% O<sub>2</sub>) einen signifikanten Unterschied ( $p = 5,4 \times 10^{-5}$ ) zwischen induzierten und nicht induzierten Proben erbrachte, zeigte sich bei uneingeschränkter Zellproliferation auch nach 21 Tagen osteogener Induktion keine wesentliche mit Alizarin-Rot anfärbbare Matrixdeposition (Hypoxie induziert: 65,3 $\mu$ M, SD 4,7 / Hypoxie nicht induziert: 39,1 $\mu$ M, SD 2,2). Dies bestätigt unsere These, dass Hypoxie die osteogene Differenzierung von hMSC verhindert (Abb. 26 B, Abb. 27). In den Zellproben, die unter Normoxie (21% O<sub>2</sub>) und Zusatz von 100 $\mu$ mol DFO kultiviert und induziert worden waren, wurde die Toxizität des DFO bei Langzeitanwendung deutlich. Weder in den osteogen induzierten, noch in den nicht osteogen induzierten Proben kam es unter 100 $\mu$ mol DFO zu einer erwartungsgemäßen Proliferation der hMSC. Es fanden sich mikroskopisch keine mit Alizarin-Rot anfärbbare Ablagerungen extrazellulärer Matrix (Normoxie - DFO induziert: 26,7 $\mu$ M, SD 3,9 / Normoxie - DFO nicht induziert: 25,4 $\mu$ M, SD 3,3) (Abb. 26 C). Auch in der anschließenden Quantifizierung bestätigte sich in diesem Ansatz kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,631$ ) (Abb. 27). Die Ergebnisse zeigen, dass die HIF-1 $\alpha$  Herabregulation mittels silencing-RNA unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) zu keinerlei Einschränkungen hinsichtlich der Proliferation der hMSC führte. Es fanden sich mikroskopisch keine durch Alizarin-Rot-Färbung nachweisbare extrazelluläre Kalzifikationen (Hypoxia - siRNA induziert: 44,6 $\mu$ M, SD 2,4 / Hypoxia - siRNA nicht induziert: 39,9 $\mu$ M, SD 1,0) (Abb. 26 D). Ähnlich wie unter Hypoxiebedingungen zeigten sich auch im siRNA-Ansatz in der photometrischen Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung signifikant erhöhte Werte ( $p = 0,012$ ) in den induzierten

gegenüber den nicht induzierten Proben (Abb. 27). Verglichen mit den quantitativen Ergebnissen der erfolgreichen Differenzierung unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) erwiesen sich diese Werte jedoch alle als vernachlässigbar klein. Die Verminderung der Expression von HIF-1 $\alpha$  mittels siRNA im Vergleich zu den rein hypoxischen Proben zeigte in diesem Ansatz keinen maßgeblichen Einfluss auf die Matrixdeposition und die osteogene Differenzierung (Abb. 26 D, Abb. 27).

## 4. Diskussion

### 4.1. Hypoxie als Chance und Hürde im Rahmen des zellbasierten *Tissue Engineering*

Der Einsatz von adulten, multipotenten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) innerhalb der regenerativen Medizin weckt derzeit große Hoffnungen, dass demnächst dank *Tissue Engineering* auch die Reparatur großer Gewebedefekte im Bereich unserer Möglichkeiten liegen wird (Vacanti, 2006; Drosse et al., 2008; Schieker et al., 2008; Schieker und Mutschler, 2006; Fotia et al., 2015). Bevor dieses Ziel jedoch erreicht werden kann, muss noch eine Reihe von Hindernissen überwunden werden. Eines der größten Hindernisse ist hierbei die adäquate Versorgung der hMSC mit Sauerstoff. Gerade in der frühen Phase *post implantationem* ist die Sauerstoffversorgung noch nicht gewährleistet, da zu dieser Zeit noch keine eigenen Blutgefäße in die implantierten *Tissue-Engineering-Konstrukte* eingewachsen sind (Volkmer et al., 2008; Malda et al., 2007; Polykandriotis et al., 2006; Arkudas et al., 2007). Auf der anderen Seite ist Hypoxie im Rahmen der Knochenentwicklung und Frakturheilung ein wichtiges, zentrales Stimulans (Wan et al., 2008), da ischämieinduziert auch Progenitorzellen via SDF-1 durch hypoxieinduzierte Hif-1 $\alpha$  Produktion an den Ort der Gewebsschädigung rekrutiert werden (Ceradini et al., 2004). Außerdem ist auch das natürliche Mikroumfeld der hMSC von Hypoxie geprägt, was sich wiederum auf die Eigenschaften ebendieser Zellen auswirkt (Grayson et al., 2007; Ceradini et al., 2004; Fotia et al., 2015). Daher muss ein besseres Verständnis über den Einfluss von Hypoxie auf zelluläre Prozesse wie Zellproliferation und Differenzierung angestrebt werden.

### 4.2. Sicherstellung definierter Sauerstoffkonzentrationen im Kulturmedium und auf Zellebene

Will man den Einfluss hypoxischer Umgebungsatmosphären auf das Proliferationsverhalten und Differenzierungsverhalten von hMSC untersuchen, ist es von erstrangiger Bedeutung sicherzustellen, dass im Rahmen der verschiedenen



Versuchsanordnungen auch sicher diejenigen hypoxische Zustände auf Zellniveau herrschen, deren Effekte man untersuchen will. Es ist enorm wichtig, die Nachweisbarkeit der jeweiligen Sauerstoffkonzentrationen in den Zellen zu analysieren und zu bestätigen, bevor man weitere Details des Zellmetabolismus unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) untersucht. In unserer Studie wurden die Zellen bei einem Sauerstoffpartialdruck von 2% O<sub>2</sub> (Hypoxie) in einem Hypoxieinkubator kultiviert. Bei korrekter Handhabung während der Experimente garantiert dieser konstant niedrige Sauerstoffkonzentrationen. Die Bandbreite der Variabilität des Sauerstoffabfalls im Hypoxieinkubator ist jedoch ausgesprochen groß. Gerade in Bereichen von O<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 5% und 2% O<sub>2</sub> ist der Verlauf der Sauerstoffsättigung stark abhängig von der Frequenz mit welcher der Hypoxieinkubator geöffnet wird. Häufiges Öffnen und Schließen der Türen des Hypoxieinkubators sollte unbedingt vermieden werden. Wie wir zeigen konnten, erhöht häufiges Öffnen nicht nur den atmosphärischen Sauerstoffpartialdruck im Hypoxieinkubator, sondern auch die Sauerstoffkonzentration im Zellkulturmedium. Werden gleichzeitig Sauerstoff verbrauchende Zellen in den Proben kultiviert, kommt es zu einem beschleunigten Abfall der Sauerstoffkonzentration. Unsere zu diesem Thema relevanten Voruntersuchungen haben gezeigt, dass es bei Kultur von murinen Osteoprogenitorzellen (MC3T3) im 2-D Modell zum raschen Abfall der Sauerstoffkonzentration kommt. Bei Konfluenz der MC3T3 fällt die Sauerstoffkonzentration auch bei Kultur unter Normoxiebedingungen auf etwa 10% O<sub>2</sub> ab (Volkmer et al., 2008). Im Labor EXPERIMED für experimentelle Chirurgie und regenerative Medizin wurden diese Kenntnisse über den Verlauf der Sauerstoffsättigung im Kulturmedium konsequent angewendet. Da häufiges Öffnen des Hypoxieinkubators die Sauerstoffkonzentration im Zellkulturmedium beeinflussen kann, wurde häufiges Öffnen der Türen des Hypoxieinkubators während der Experimente konsequent vermieden. Zusätzlich konnten wir während der Versuche mittels simultaner, fluorimetrischer Sauerstoffmessung (Oxygen Microsensors, Oxodish, Presens, Regensburg, Deutschland) die jeweiligen Sauerstoffkonzentrationen direkt kontrollieren (Volkmer et al., 2008; Volkmer et al., 2010). Dass unter Versuchsbedingungen nachweisbar intrazelluläre, hypoxische Zustände vorlagen, wurde durch eine positive Pimonidazol-Färbung bestätigt. Pimonidazol bildet hierbei in Geweben und Zellen Addukte, die anschließend mit Pimonidazol-Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen werden können. Diese

Addukte bilden sich nur dann, wenn der intrazelluläre Sauerstoffpartialdruck in den Nachweisbereich von Pimonidazol absinkt. Dieser liegt für Sauerstoff bei etwa 10 mmHg und niedriger (Mowat et al., 2010), und wird demnach bei einer Sauerstoffkonzentration von 2% O<sub>2</sub> sicher erreicht. Hypoxie auf Einzelzellniveau konnten wir darüber hinaus auch durch den direkten Nachweis von Hif-1 $\alpha$  bestätigen. Hif-1 $\alpha$  ist ein ubiquitär exprimierter Mediator im Rahmen der zellulären Antwort auf Hypoxie. Hif-1 $\alpha$ -Protein spielt als zentraler Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle innerhalb der Umstellung vom aeroben zum anaeroben Zellmetabolismus. Im Rahmen dessen aktiviert Hif-1 $\alpha$  zahlreiche Gene der aeroben Glykolyse, der Angiogenese, Erythropoese und Gefäßweitstellung (Semenza et al., 1994; Semenza et al., 1991; Rolfs et al., 1997; Bianchi et al., 1999; Forsythe et al., 1996). All diesen Genen sind sogenannte *Hypoxia Responsive Elements* (HRE) vorgeschaltet (Ke und Costa, 2006). Da die PHDs von molekularem Sauerstoff abhängig sind, unterbleibt in hypoxischen Zellen die Hydroxylierung der Prolylreste im HIF-1 $\alpha$ -Protein. Unter Normoxiebedingungen führt diese Hydroxylierung zunächst zur Anlagerung von VHL und anschließend zur Ubiquitinylierung von Hif-1 $\alpha$  und infolge zu seinem proteasomalen Abbau. In unseren Experimenten unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) wurde HIF-1 $\alpha$  nachweislich in den Zellkern transloziert, wo es mit HIF-1 $\beta$  dimerisiert (Wang et al., 1995). Der Dimer aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  nimmt dann im Zellkern seine Funktion als zentraler Regulator der zellulären Antwort auf Hypoxie auf. In unseren Studien konnten wir HIF-1 $\alpha$ -Protein im Western Blot in den unmodifizierten, hypoxischen und anoxischen Proben reichlich nachweisen. HIF-1 $\alpha$ -Protein war im Western Blot ausschließlich im Kernkompartiment der Zelle nachweisbar, was seine Funktion als Transkriptionsfaktor unterstreicht. In den normoxischen Proben ließ sich HIF-1 $\alpha$ -Protein im Western Blot generell nicht nachweisen. Gemeinsam mit den Ergebnissen der fluorimetrischen Sauerstoffmessung und der positiven Pimonidazolfärbung, bestätigt dies, dass die Zellen in unseren Experimenten tatsächlich hypoxischen Verhältnissen ausgesetzt waren.

### **4.3. Hypoxie hat keinen negativen Einfluss auf das zelluläre Proliferationsverhalten**

Bei der Durchführung von Experimenten unter Hypoxieatmosphäre (2% O<sub>2</sub>) ist es notwendig das Proliferationsverhalten der Zellen zu untersuchen, um Vergleiche

zwischen deren spezifischem Proliferationsverhalten unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>), hypoxischen (2% O<sub>2</sub>) und anoxischen (0% O<sub>2</sub>) Kulturbedingungen ziehen zu können. Bei Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen über einen Zeitraum von 14 Tagen konnten wir zeigen, dass Hypoxie von 2% O<sub>2</sub> keinerlei zytotoxische Effekte auf die Zellen hat und deren Proliferationsverhalten dadurch nicht negativ beeinflusst wird. Die Proliferationskurven der untersuchten Zellen unter Hypoxie- und Normoxiebedingungen verliefen über einen Zeitraum von 2 Wochen nahezu parallel. Signifikante Unterschiede hinsichtlich des Zellwachstums unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen ließen sich nicht verzeichnen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei Volkmer et al. In dieser Studie zeigte sich sogar eine verbesserte Proliferation von hMSC unter Hypoxiebedingungen, die an Tag 8 bei der absoluten Zellzahl und an den Tagen 5, 13 und 18 im *Water Soluble Tetrazolium - Assay* (WST) signifikant wurde (Volkmer et al., 2010). Im WST-Assay wurde in der angeführten Studie ein wasserlösliches Tetrazalin-Salz von den Zellen reduziert. Diese Reduktion führt zu einem Formazan-Salz, dessen Konzentration photometrisch im ELISA ermittelt wurde. Die ermittelte Konzentration ist direkt proportional zur Zellzahl. Auch Iida et al. konnten zeigen, dass es unter Hypoxiebedingungen bei 3% O<sub>2</sub> zu signifikant erhöhten Proliferationsraten bei *human Dental Pulp Cells* (hDPCs) kommt (Iida et al., 2010). Studien von Grayson et al. zeigten analog, dass hMSC in einem hypoxischen Milieu (2% O<sub>2</sub>), schneller proliferierten als entsprechende unter Normoxie gezüchtete Zellen. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass dieser Trend in hMSC über mehrere Zellpassagen anhielt und dass hMSC hierbei ihre hohen Wachstumsraten sogar dann beibehielten, wenn zwischenzeitlich Konfluenz erreicht wurde (Grayson et al., 2007). Auch weitere Arbeitsgruppen konnten aktuell bestätigen, dass Hypoxie das Zellwachstum verbessert (Tsai et al., 2010; Carrancio et al., 2008). Aus diesen Gründen hat die Arbeitsgruppe um Carrancio, die sich besonders der Optimierung der *in vitro* Kulturbedingungen von hMSC widmet, die These aufgestellt, die bisher etablierten Zellkultur-Methoden für hMSC zugunsten einer Kultur unter Hypoxiebedingungen bei 5% O<sub>2</sub> zu verändern (Carrancio et al., 2008; Lopez und Spencer, 2011). Im Einklang mit diesen Daten konnte gezeigt werden, dass nicht intermittierende, dauerhafte Hypoxie außerdem das Wachstum von humanen Knochenmarkszellen (Ren et al., 2006), humanen Nervenvorläuferzellen (Zhao et al., 2008), und humanen embryonalen Stammzellen befördert (Ezashi et al., 2005). Dies

bringt die Hypothese auf, dass ein hypoxisches Umfeld in erster Linie hilft, das Potenzial der Zellen zu nahezu unendlicher Selbstreplikation zu erhalten und damit den Erhalt ihrer Stammzeleigenschaften befördert. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Studien von Holzwarth et al., Chung et al. sowie Lee et al. In deren Ansatz führte ein hypoxisches Milieu von 1% O<sub>2</sub> zu langsamerem Zellwachstum als in der normoxischen Vergleichspopulation (Holzwarth et al., 2010) und zu reduzierter Fähigkeit Zellkolonien zu bilden (Lee et al., 2015). Bei Chung et al. führte sogar eine hypoxische Umgebungsatmosphäre von 5% O<sub>2</sub> noch zur Beeinträchtigung der Proliferation von caninen MSC, egal ob sie aus dem Knochenmark, oder dem Fettgewebe (AT-cMSC) isoliert worden waren. In zwei weiteren Studien führten schwankende Sauerstoffkonzentrationen in hMSC zu einer Verminderung ihres Wachstums und ihrer Fähigkeit Zellkolonien zu bilden (Potier et al., 2007; Hung et al., 2007). Plötzliche Abfälle sowie Schwankungen des Sauerstoffpartialdruckes scheinen sich dementsprechend negativ auf die Proliferationskapazität von hMSC auszuwirken.

#### 4.4. Anoxie und HIF-1 $\alpha$

Bei unserer Kultur von hMSC unter Anoxiebedingungen (0% O<sub>2</sub>) im Anaerojar kam es nach einer minimalen Wachstumsphase von 24 Stunden spätestens nach 4 Tagen zum Absterben aller Zellen. Gleichzeitig konnten wir im Western Blot in den anoxischen Proben enorm hohe Mengen von HIF-1 $\alpha$ -Protein nachweisen. Seit Bruick ist bekannt, dass hypoxieinduzierte HIF-1 $\alpha$  Induktion über NIP3-Aktivierung die Apoptose induziert, wenn sich die Zellen im Zustand dauerhaften Sauerstoffentzugs befinden. Dieser Weg spielt besonders im Verlauf des Zelltodes bei zerebraler oder myokardialer Ischämie eine Rolle (Bruick, 2000). Auch die Arbeitsgruppe um Xenaki konnte bestätigen, dass es in Osteosarkom-Zellen zu einer HIF-1 $\alpha$ -abhängigen Apoptose kommt. Hier sind der HIF-1 $\alpha$  Kofaktor PCAF und das proapoptotische HIF-1 $\alpha$  *Target-Gen* BID von zentraler Bedeutung (Xenaki et al., 2008). Im Gegensatz dazu zeigten Sendoel et al., dass das HIF-1 $\alpha$ -Homolog in *C. elegans* in Keimzellen die Apoptose verhindert, indem es CEP1, das Homolog für das Tumorsuppressorgen p53 in *C. elegans* inaktiviert. Die antiapoptotische Fähigkeit von HIF-1 $\alpha$  wirkt hier

über Induktion der Tyrosinase TYR2. Der gleiche Wirkungsweg mit HIF-1 $\alpha$ -abhängiger p53-Inaktivierung über Tyrosinasen ließ sich auch für humane Melanomzellen nachweisen, in denen sich durch Knock-Down von TYR2 deren Apoptoserate steigerte (Sendoel et al., 2010). Unsere Studie zeigte, dass anoxische Perioden nur etwa 24 Stunden lang gut von hMSC toleriert werden, was auch Ergebnisse von Salim et al. bestätigten (Salim et al., 2004). Untersuchungen unserer Forschungsgruppe zeigten außerdem, dass es aufgrund der Puffereigenschaften des Kulturmediums nicht zu einer zusätzlichen pH-Verschiebung ins azidotische Milieu kommt (Volkmer et al., 2012). Daher gehen wir in unserem oben beschriebenen Setting davon aus, dass es aufgrund des über 4 Tage anhaltenden, dauerhaften Sauerstoffentzugs im Anaerojar zur HIF-1 $\alpha$ -induzierten Apoptose der Zellen gekommen ist.

#### **4.5. Hypoxie erleichtert die Bewahrung des Stammzellcharakters in hMSC**

Obwohl immer noch genau festgelegt werden muss, ab welcher Sauerstoffkonzentration Kultivierungsbedingungen als hypoxisch gelten, wird mittlerweile weitgehend angenommen, dass 21% O<sub>2</sub>, wie es normalerweise für die Zellkultur von hMSC verwendet wird, eher einen Zustand künstlicher Hyperoxie darstellt. In Konsequenz werden nun niedrige Sauerstoffkonzentrationen als das physiologischere Milieu für Stammzellen erachtet (Volkmer et al., 2010; Grayson et al., 2007; Lennon et al., 2001; Malda et al., 2007). Denn auch am ursprünglichen Ort des Vorkommens von hMSC im Organismus, der so genannten Stammzellnische im Knochenmark, entstehen Sauerstoffgradienten mit hypoxischen bis stark hypoxischen Zuständen (Ceradini et al., 2004). So liegt die mittlere Sauerstoffkonzentration innerhalb des Knochenmarks, bei nur etwa 5% O<sub>2</sub> (Grayson et al., 2006). Die Idee einer Stammzellnische wurde 1978 erstmals von Schofield beschrieben (Schofield, 1978). Nach seinem Konzept repräsentiert die Stammzellnische eine spezielle Mikroumgebung für Stammzellen, unterstützende Bindegewebszellen und deren Sekretionsprodukte. In dieser Umgebung sollten hämatopoetische Stammzellen (HSC) unbegrenzt proliferieren können ohne ihre Stammzelleigenschaften zu verlieren. Sein Modell lässt sich direkt auf mesenchymale Stammzellen übertragen. (Kuhn und Tuan, 2010). Cipolleschi

beschrieb die Stammzellnische ferner als ein Areal mit extremem Sauerstoffmangel (Cipolleschi et al., 1993; D'Ippolito et al., 2006). Deswegen geht man davon aus, dass mesenchymale Stammzellen sich im Knochenmark in einem hypoxischen Milieu aufhalten und dort gemeinsam mit HSC koexistieren (Simsek et al., 2010; Ma et al., 2009). Man nimmt an, dass ihre unreifen Vorläuferzellen in Regionen mit Sauerstoffmangel vorkommen, wohingegen weiter entwickelte Vorläuferzellen, ähnlich wie Perizyten, gefäßnahe Areale mit höherem Sauerstoffgehalt vorziehen (D'Ippolito et al., 2006). Die Nähe zu den Blutgefäßen macht es diesen Zellen dann möglich, im Rahmen der Antwort auf Verletzung oder Krankheit mit dem Blutstrom in benachbarte oder entferntere Gewebe zu migrieren (Kuhn und Tuan, 2010). Eine wichtige Rolle für die Erhaltung von Stammzeleigenschaften spielt u.A. auch hypoxieinduziertes HIF-1 $\alpha$ , das durch Hochregulation von TWIST über epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) Zellen mit Stammzeleigenschaften erzeugen kann (Tsai et al., 2010). Unsere Studie zeigte, dass hMSC zwar unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) uneingeschränkt proliferieren können, sich aber nicht osteogen differenzieren lassen. Dies lässt sich gut mit dem oben beschriebenen Modell in Einklang bringen, das vorsieht, dass hypoxische Verhältnisse die Stammzeleigenschaften von hMSC erhalten und Seneszenz vermeiden (D'Ippolito et al., 2006; Tsai et al., 2010; Choi et al., 2014; Fotia et al., 2015).

#### **4.6. Hypoxie verhindert die osteogene Differenzierung von hMSC**

Der große Vorteil von hMSC besteht zum einen in ihrer einfachen Gewinnung aus verschiedensten Gewebearten wie Knochenmarksaspiraten (Beltrami et al., 2007; Ciapetti et al., 2006), Fettgewebe (Schaffler und Buchler, 2007; Lee et al., 2004; Levi et al., 2010; Cowan et al., 2004; Zuk et al., 2001), Muskelgewebe (Peng und Huard, 2004; Jiang et al., 2002), Nabelschnurblut (Nagano et al., 2010), Amnionflüssigkeit, oder peripherem Blut (Kuznetsov et al., 2001). Außerdem besitzen adulte Stammzellen ebenso wie embryonale Stammzellen die Möglichkeit zur Selbstreplikation. Die Verwendung von hMSC im Rahmen therapeutischer Zwecke lässt die Diskussion der ethischen Aspekte vermeiden, die sich bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen zu Forschungs- oder Therapie Zwecken ergibt. Das große therapeutische Potenzial dieser adulten, multipotenten Stammzellen für das *Tissue Engineering* liegt vor allem in ihrer Fähigkeit sich in Knochen, Knorpel und

Fettgewebe differenzieren zu lassen (Pittenger et al., 1999). Der Differenzierungsprozess von hMSC *in vitro* ist dabei ein unumgänglicher Schritt. hMSC, die im Rahmen des *Tissue Engineering* von Knochengewebe zu therapeutischen Zwecken verwendet werden, müssen an ihrem Implantationsort niedrigen Sauerstoffkonzentrationen von unter 5% O<sub>2</sub> trotzen. Daher war es eines unserer Ziele, den Prozess der osteogenen Differenzierung unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen genauer zu untersuchen. Unsere Studie zeigte, dass eine hypoxische Atmosphäre von 2% O<sub>2</sub> über den gesamten 21-tägigen Zeitraum der osteogenen Induktion die osteogene Differenzierung von hMSC verhindert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit zahlreichen weiteren Studien, die ebenfalls einen negativen Effekt von Hypoxiebedingungen auf die osteogene Differenzierung von hMSC betätigen konnten (Potier et al., 2007; D'Ippolito et al., 2006; Holzwarth et al., 2010; Fehrer et al., 2007). Außerdem gilt dieses Erkenntnis nicht nur für humane MSC sondern auch für murine Knochenvorläuferzellen (Malladi et al., 2007; Ren et al., 2006; Salim et al., 2004), Knochenvorläuferzellen aus Ratten (Lopez und Spencer, 2011; Utting et al., 2010), canine cMSC (aus dem Knochenmark) und canine AT-cMSC (aus dem Fettgewebe) (Chung et al., 2010), sowie für *Human Dental Pulp Cells* (hDPCs), die ebenfalls osteogene Vorläuferzellen darstellen (Iida et al., 2010). In Studien an caninen cMSCs, die aus verschiedenen Geweben isoliert worden waren, kam es bei cMSC, aus dem Fettgewebe (AT-cMSC) weder unter 1% O<sub>2</sub> noch unter 5% O<sub>2</sub> zu einer adäquaten osteogenen Differenzierung. Nur unter 21% O<sub>2</sub> ließen sich die Zellen unbeeinträchtigt osteogen differenzieren (Chung et al., 2010). Das Ausmaß der osteogenen Differenzierung scheint direkt mit der Menge an verfügbarem Sauerstoff sowie dem Adaptationszustand der Zellen an hypoxische Verhältnisse zu korrelieren. Während niedrige Sauerstoffkonzentrationen von 1% O<sub>2</sub>, die Zellen sowohl in ihrem Proliferationsverhalten beeinträchtigen, als auch die osteogene Differenzierung verhindern, ermöglichte schon ein Anheben der Sauerstoffkonzentration auf 3% O<sub>2</sub> wieder eine erfolgreiche osteogene Differenzierung (Holzwarth et al., 2010). Für AT-cMSC aus dem Fettgewebe postulieren Fotia et al. dagegen eine duale Wirkung von Hypoxie, die einerseits in Abwesenheit osteogener Stimuli Zellproliferation und Erhaltung der Stammzeleigenschaften begünstigt, aber in einem knochenähnlichen Microenvironment die Differenzierung induziert (Fotia et al., 2015).

Analog zu unserer Studie haben Volkmer et al. festgestellt, dass die osteogene Differenzierung von naiven hMSC unter Hypoxieatmosphäre von 2% O<sub>2</sub> inhibiert wird. Wurden die Zellen allerdings vor der Differenzierungsphase für 3 Tage unter 2% O<sub>2</sub> hypoxisch präkonditioniert, so konnte anschließend eine erfolgreiche osteogene Differenzierung erfolgen, die mittels Alizarin-Rot-Färbung nachweisbar war (Volkmer et al., 2010). Auch in der vorliegenden Studie zeigten wir, dass hypoxische Kultivierungsbedingungen (2% O<sub>2</sub>) über 21 Tage die osteogene Differenzierung verhindern. Die Proliferationskapazität der Zellen blieb dabei jedoch unbeeinflusst. Im Kontext dazu müssen die Ergebnisse von Salim et al. diskutiert werden. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass eine kurzzeitige Belastung von pluripotenten, mesenchymalen Knochenvorläuferzellen mit Anoxie unter 0.02% O<sub>2</sub> aber nicht mit Hypoxie von 2% O<sub>2</sub> die Expression von Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) und RUNX2 herabreguliert und damit die osteogene Differenzierung inhibiert (Salim et al., 2004). Dies führt zu der Annahme, dass für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung, sowohl eine gewisse Mindestverfügbarkeit von Sauerstoff nötig ist, und auch die bereits erfolgte Anpassung der Zellen an hypoxische Milieus eine wichtige Rolle spielt.

#### **4.7. Hypoxie und HIF-1 $\alpha$ -Expression**

Gewebshypoxie ist ein zentrales Phänomen innerhalb der Pathophysiologie zahlreicher Krankheitsbilder. Neben der Beteiligung von hypoxieinduziertem HIF-1 $\alpha$  im Rahmen der Knochenbildung und Frakturheilung, sind Hypoxie und die damit verbundene HIF-1 $\alpha$ -Expression auch an zahlreichen weiteren Krankheiten beteiligt. Hierzu zählen myokardiale, zerebrale und retinale Ischämie, pulmonale Hypertension, Präeklampsie, intrauterine Wachstumsretardierung und auch Krebserkrankungen (Semenza, 2000).

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  in hMSC auf mRNA Ebene kontinuierlich exprimiert wird. Wir konnten außerdem bestätigen, dass die Expression von HIF-1 $\alpha$  in hMSC auf mRNA Ebene nicht von der anliegenden Sauerstoffkonzentration abhängig ist. HIF-1 $\alpha$ -mRNA wird in hMSC sowohl unter Anoxie- (0% O<sub>2</sub>), Hypoxie- (2% O<sub>2</sub>), als auch unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) gleichermaßen stark exprimiert. Zudem konnten wir darstellen, dass die HIF-1 $\alpha$ -



mRNA Expression unabhängig von der Dauer des Sauerstoffentzugs ist. In der PCR erschienen die Banden für HIF-1 $\alpha$ -mRNA nach 20 Stunden Hypoxie vergleichbar ausgeprägt, wie nach 20 Stunden Kultur unter Normoxiebedingungen. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Studie von Wenger et al. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass HIF-1 $\alpha$  ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird, wobei es gewebespezifische Unterschiede gibt. So wird HIF-1 $\alpha$  in murinen Lungen und Nieren besonders stark exprimiert (Wenger et al., 1996). Wir konnten in dieser Studie ebenfalls nachweisen, dass es in hypoxischen Zellen und Zellverbänden nicht zu einer Hochregulation von HIF-1 $\alpha$ -mRNA kommt.

HIF-1 $\alpha$  spielt als zentraler Transkriptionsfaktor eine wesentliche Rolle im Rahmen der Sauerstoffhomöostase. Während die generelle Proteinsynthese im Allgemeinen unter Hypoxiebedingungen blockiert wird, kommt es gleichzeitig zur Erhöhung des VEGF-mRNA Levels, das durch HIF-1 $\alpha$  induziert wird. HIF-1 $\alpha$  bindet hierbei an ein HRE etwa 5000 Basen vor dem Transkriptionsstart von VEGF (Semenza, 2000). Durch Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  mit der entsprechenden *small interference RNA* (siRNA) kommt es infolgedessen auch zu einer verminderten Expression des HIF-1 $\alpha$ -*Target-Gens* VEGF (Zhang et al., 2007).

In unserer Studie konnten wir ebenfalls beobachten, dass der Knock-Down von HIF-1 $\alpha$  mittels HIF-1 $\alpha$ -siRNA nach 24 Stunden einen Abfall der VEGF-mRNA in hMSC zufolge hatte. Die Ursache dafür, dass die beobachtbare Verminderung der VEGF-mRNA in der PCR weniger stark ausgeprägt war als der ursächliche Knock-Down von HIF-1 $\alpha$ , könnte auf Überschneidungen im Wirkspektrum von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  zurückzuführen sein. Sowohl der Verlust von HIF-1 $\alpha$  als auch von HIF-2 $\alpha$  führt zu starker Reduktion der VEGF-mRNA Expression (Shomento et al., 2010). Aber es ist bekannt, dass HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  zum Teil redundante Effekte erzeugen und sich gegenseitig in ihrer Wirkung unterstützen und ersetzen können. Dieser Aspekt ist insbesondere deswegen interessant, da Shoshan et al. nachweisen konnten, dass HIF-2 $\alpha$  in *Bone Marrow Stromal Cells* (BMSC) zu einer stärkeren VEGF-Induktion führte als HIF-1 $\alpha$  (Ben Shoshan et al., 2008).

Ebenso wie Wang et al., konnten wir zeigen, dass HIF-1 $\alpha$ -Protein durch Zugabe des Eisenchelators Desferrioxamin (C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>) (DFO) auch unter Normoxie-

bedingungen stabil und dadurch als Protein hochreguliert bleibt. DFO greift hierbei auf Proteinebene direkt in den Regulations- und Abbaumechanismus von HIF-1 $\alpha$  ein. HIF-1 $\alpha$  wird unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) normalerweise an seinen Prolylresten hydroxyliert, nachfolgend ubiquitinyliert und nach Bindung an das von Hippel Lindau-Protein (VHL) proteasomal abgebaut (Nakayama et al., 2004). Bei der Prolylhydroxylase (PHD) handelt es sich um ein Ferroenzym mit Eisen als Zentralion. Die PHDs sind bei der Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  von molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) abhängig, so dass die Hydroxylierung der Prolylreste (P402, P564) (Ke und Costa, 2006) nur in unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) ablaufen kann. Da die positiven Ladungen von Eisen(III)-Ionen hochgradig affin für die negativen Teilladungen ( $\delta^-$ ) innerhalb des DFO Moleküls sind, kann DFO als Eisenchelator den PHDs ihr Zentralion entziehen. Infolgedessen kann HIF-1 $\alpha$  nicht mehr abgebaut werden (Guo et al., 2006). Ein ähnlicher Effekt wie durch DFO lässt sich auch durch Applikation von Kobaltionen erzeugen. Die toxischen Schwermetallionen des Kobalts verdrängen hierbei das Eisen(III)-Ion aus den PHDs. In der vorliegenden Studie wurde der starke Eisenchelator Desferrioxamin verwendet. DFO entreißt den PHDs ihr katalytisches Eisenion, da die Affinität der positiven Eisen(III)-Ionen für die negativen Partialladungen ( $\delta^-$ ) des DFO größer ist als die Bindungskräfte innerhalb der Hydroxylase. Infolge findet die Hydroxylierung der Prolylreste in der ODDD von HIF-1 $\alpha$  nicht statt und der anschließende proteasomale Abbau unterbleibt. Daher bleibt HIF-1 $\alpha$  bei Normoxie stabil und nachweisbar. Wang et al. wendete hierbei über 24 Stunden an eine Konzentration von 130 $\mu$ mol DFO an (Wang und Semenza, 1993). Wir konnten ähnliche Ergebnisse sowohl mit höheren Konzentrationen bei 150 $\mu$ mol DFO als auch mit niedrigeren Konzentrationen bei 100 $\mu$ mol DFO erzeugen. Analog zu den Studien von Guo et al. mussten wir für eine gute Darstellung der Proteine im Western Blot standardmäßig eine Konzentration von 100 $\mu$ mol DFO verwenden. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte sowohl für höhere Konzentrationen von Kobaltionen, als auch von DFO erhöhte Apoptoseraten in U937- und NB4-Zellen nachweisen (Guo et al., 2006). Für kurze Zeit wird DFO auch in Dosierungen bis zu 200 $\mu$ mol von den Zellen toleriert. Im Rahmen langer Kultivierungsperioden, wie sie während der osteogenen Differenzierung vorkommen, zeigte sich allerdings schon bei dauerhaften Konzentrationen von 100 $\mu$ mol DFO die Toxizität des Eisenchelators.

#### 4.8. Einfluss von HIF-1 $\alpha$ auf die osteogene Differenzierung von hMSC

In dieser Studie konnten wir darstellen, dass ein hypoxisches Milieu von 2% O<sub>2</sub> die osteogene Differenzierung von hMSC verhindert. Unsere Ergebnisse zeigten, dass in hypoxischen Zellen im Western Blot reichlich HIF-1 $\alpha$  Protein im Kernkompartiment der Zellen nachweisbar war. Nachdem kürzlich gezeigt werden konnte, dass HIF-1 $\alpha$  *in vivo* einen fördernden Einfluss auf die Knochenheilung hat, lag es nahe, diese These auch für das *in vitro* Modell der osteogenen Differenzierung zu überprüfen.

Im *in vivo* Modell von VHL-defizienten Mäusen ( $\Delta$ VHL-Mäusen) akkumuliert HIF-1 $\alpha$  Protein während der chondralen Ossifikation in Osteoblasten. Dies führt zu stark vaskularisierten und mineralisierten, langen Röhrenknochen. In HIF-1 $\alpha$ -defizienten Mäusen ( $\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Mäusen) kommt es dagegen zur Ausbildung schwach vaskularisierter und schwach mineralisierter Röhrenknochen. Die desmale Ossifikation der platten Schädelknochen wird hierbei jedoch nicht beeinflusst. Deshalb nimmt man an, dass die verstärkte Knochenbildung in langen Röhrenknochen vor allem den sekundären *Target-Genes* von HIF-1 $\alpha$ , insbesondere dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), und damit dem Gefäßwachstum geschuldet ist (Wang et al., 2007; Wan et al., 2010). Wan et al. konnten jedoch zusätzlich nachweisen, dass die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$ -Pathways sehr früh im Rahmen der desmalen Ossifikation, die Neubildung von Kalvarienknochen aus mesenchymalem Bindegewebe *in vivo* direkt beschleunigt (Wan et al., 2008). Dies führt zur Vermutung, dass HIF-1 $\alpha$  auch ein direkter Kofaktor während der Knochenbildung *in vivo* ist. Die Arbeitsgruppe um Zhou et al. konnte vor Kurzem außerdem zeigen, dass HIF-1 $\alpha$  als Regulator von BMP2 Einfluss auf die chondrogene, die osteogene und die enchondrale Differenzierung von hMSC nimmt (Zhou et al., 2015).

In Studien der Arbeitsgruppe von Wan führte die tägliche Bolusgabe von 200 $\mu$ mol DFO in den Frakturspalt im *in vivo* Modell zu verstärkter Neoangiogenese und infolge zu einem signifikant gesteigertem Knochenvolumen (Wan et al., 2008). Es ist anzunehmen, dass diese verbesserte Knochenheilung hier vor allem aus der HIF-1 $\alpha$  mediierten Angiogenese resultiert. Denn bei der Anwendung von 100 $\mu$ mol DFO im *in vitro* Versuch ließ sich unter Normoxiebedingungen keine verbesserte osteogene

Differenzierung der hMSC beobachten. Stattdessen führte die lange Einwirkdauer von DFO *in vitro* zum Absterben der Zellen.

Unsere *in vitro* Experimente zeigten, dass es unter HIF-1 $\alpha$ -Regulation zu keinen signifikant-sichtbaren Veränderungen hinsichtlich der osteogenen Differenzierung von hMSCs kommt. In den normoxischen Proben (21% O<sub>2</sub>) ließ sich ein deutlicher Differenzierungserfolg verzeichnen. Parallel dazu wurden hMSC osteogen differenziert, in denen der Expressionszustand von HIF-1 $\alpha$  artifiziell verändert war. In den hypoxischen Proben (2% O<sub>2</sub> + HIF-1 $\alpha$ -siRNA) wurde durch den wiederholten Knock-Down mittels siRNA-Technik die Menge an HIF-1 $\alpha$ -Protein vermindert. Genau wie auch in den Proben, die ohne Anwendung von siRNA-Technik, rein unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) differenziert wurden, ließ sich makroskopisch und mikroskopisch keine kalzifizierte Matrixdeposition nachweisen. Da in dieser Studie ausschließlich HIF-1 $\alpha$  im Zentrum des Interesses stand, müssten weitere Studien erläutern, ob Redundanzen zwischen HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  ein Sichtbarwerden der HIF-1 $\alpha$ -assoziierten Effekte auf die osteogene Differenzierung *in vitro* verschleiern. Einen Hinweis könnten hier die Ergebnisse der Studie von Shomento et al. geben. In ihrer Studie isolierten sie u.A. HIF-1 $\alpha$  defiziente Osteoblasten aus  $\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Mäusen. In diesen Osteoblasten war die Expression von HIF-1 $\alpha$  um mehr als 90% gegenüber den Normalkontrollen vermindert. Interessanterweise ließen sich  $\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Osteoblasten gut osteogen differenzieren. Auch das Expressionsniveau der knochentypischen Markergene RUNX2, OSTERIX und OSTEONALZIN war ähnlich hoch wie das Expressionsniveau dieser Markergene in den Kontrollen bei HIF-1 $\alpha$ -exprimierenden Osteoblasten. Lediglich die Zellproliferation in  $\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Osteoblasten schien durch den HIF-1 $\alpha$ -Mangel direkt beeinträchtigt (Shomento et al., 2010). Untersuchungen von Mangiavini et al. zeigten, dass HIF-1 $\alpha$  essentiell für Wachstum und Differenzierung von Chondrozyten der Epiphysenfuge ist, wohingegen HIF-2 $\alpha$  für die Entwicklung der Epiphyse nicht der gleiche Stellenwert zuzukommen scheint (Mangiavini et al., 2014).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass in *Bone Marrow Stromal Cells* (BMSC), die mit sauerstoffstabilen HIF- $\alpha$ -Formen transfiziert waren, von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  sowohl redundante als auch individuell verschiedene Effekte ausgingen. In den retroviral, jeweils einzeln, übertragenen HIF-1 $\alpha$ - oder HIF-2 $\alpha$ -analogen Formen, HIF-1\_P564A und HIF-2\_P531A waren jeweils in der ODDD die Prolinreste 564 oder 531

durch die Aminosäure Alanin ausgetauscht, was zu erhöhter Stabilität gegenüber sauerstoffinduziertem Abbau führte. Besonders hervorzuheben ist, dass in diesem Ansatz HIF-2 $\alpha$  eine stärkere VEGF-Induktion hervorrief und zu einer stärkeren Neovaskularisierung in der Corneatasche führte als HIF-1 $\alpha$  (Ben Shoshan et al., 2008). Über die spezifische Rolle von HIF-2 $\alpha$  im Rahmen der osteogenen Differenzierung ist aktuell noch zu wenig bekannt, so dass man eine diesbezügliche Überschneidung der Funktionen von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  auch *in vitro* nicht ausschließen kann.

#### 4.9. SCP-1, ein Stamm immortalisierter hMSC als Modellsystem

hMSC, bieten zahlreiche Vorteile für Anwendungen im *Tissue Engineering*, aber nur 0,001-0,1% aller kernhaltigen Zellen die aus dem Knochenmark gewonnen werden können, sind MSC. Die niedrige Ausbeute, macht vor der klinischen Anwendung eine Expansion der MSC *in vitro* nötig. Die Nutzung von hMSC im *Tissue Engineering* benötigt hohe Zellzahlen, und die MSC neigen dazu seneszent zu werden, bevor sie zur benötigten Zellzahl expandiert sind (Stenderup et al., 2003). Es wurde berichtet, dass hMSC ihr Proliferations-, Homing- und Differenzierungspotenzial verlieren, sobald sie ein Maximum von etwa 20-40 Populationsverdopplungen *in vitro* erreicht haben (Bruder et al., 1997; Digirolamo et al., 1999; Schallmoser et al., 2010; Banfi et al., 2000). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der Verlust der Telomere eine entscheidende Rolle für die Lebenszeit somatischer Zelllinien in Zellkultur spielt (Schieker et al., 2004; Baxter et al., 2004; Bodnar et al., 1998). Die Länge der Telomere nimmt mit jeder Zellteilung ab und mündet letztendlich in Seneszenz und Wachstumsarrest. Durch Aktivierung der Telomerase, einem Ribonucleinkomplex mit reverser Transkriptaseeigenschaft, können die Telomere trotz Zellteilung erhalten werden. hMSC fehlt diese Eigenschaft *in vitro* (Parsch et al., 2004; Zimmermann et al., 2003). Aus diesem Grund haben viele Arbeitsgruppen hMSC durch Übertragung einer *human Telomerase reverse Transcriptase* (hTert) mit konstitutivem Promotor immortalisiert. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die Übertragung von hTERT den seneszenzbedingten Wachstumsarrest verhindert. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die hTERT-transfizierten-hMSC sich weiterhin osteogen, chondrogen und adipogen differenzieren ließen (Nakahara et al., 2009; Jun et al., 2004; Mihara et al., 2003; Shi et al., 2002; Simonsen et al., 2002). Nakahara et al. konnten

nachweisen, dass mittels hTERT immortalisierte hMSC im Mausmodell *in vivo* Knochen bilden konnten (Nakahara et al., 2009). Das Labor für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin hat ebenfalls über lentiviralen Gentransfer von hTERT unter einem konstitutiven Promotor eine immortalisierte Zelllinie entwickelt. Hierzu wurden Lentiviren als Vektor gewählt, da bekannt ist, dass Lentiviren ein niedriges tumorigenes Potenzial aufweisen. Die Übertragung von genomischem Material durch Retroviren weist gegenüber lentiviraler Übertragung ein erhöhtes Potenzial zur malignen Entartung auf. Der Zellspender hierfür war eine 25-jährige gesunde Frau kaukasischer Abstammung (hMSC-Donor XIV; Lonza). Wir bezeichnen diese Zellen als SCP-1 (*Single Cell Picked-Clone-1*). Eine weitere wichtige Eigenschaft der SCP-1 ist, dass sie etwas schneller proliferieren als die ursprünglichen hMSC. SCP-1 befanden sich um die 70. Passage immer noch in der exponentiellen Phase ihres Wachstums. Nach mehr als 700 Tagen Kultur hatte sich außerdem eine besonders gut proliferierende Subpopulation mit zumeist spindelförmiger Zellform herauskristallisiert, die morphologisch ähnlich den *rapidly-selfrenewing Cells* (RS-Cells bei untransfizierten hMSC) war. Nicht transfizierte hMSC waren dagegen schon nach etwa 200 Tagen seneszent geworden (Böcker et al., 2008). Dieser Befund steht im Einklang mit weiteren Publikationen, die ebenfalls bestätigen konnten, dass immortalisierte adulte Stammzellen verbesserte Proliferationsfähigkeiten besitzen (Flores et al., 2005; Smith et al., 2003). Dies bringt den Vorteil mit sich, dass man SCP-1 in relativ kurzer Zeit zu hohen Zellzahlen expandieren kann. Im Gegensatz zu untransfizierten hMSC, die nach langer *in vitro* Kultur ihr Differenzierungspotenzial verlieren, konnten Böcker et al. beobachten, dass auch extensive Kultur von hTERT-exprimierenden hMSCs keinen Einfluss auf deren Stammzellcharakter hatte. SCP-1 Zellen behielten die Fähigkeit sich in osteogener, chondrogener und adipogener Linie differenzieren zu lassen (Böcker et al., 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Zellen selbst nach zwei Jahren in Kultur keinerlei Kennzeichen maligner Transformation aufwiesen. SCP-1 führten bei subkutaner Implantation im Mausmodell bei immundefizienten, athymen Mäusen nicht zu neoplastischer Entartung (Böcker et al., 2008). In unseren Studien konnten wir beobachten, dass SCP-1 nach 13 Tagen Zellkultur im 12 well, unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) in 100% Zellkonfluenz ihre Plateauphase erreichten, und es zum Proliferationsstop kam. Unter Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) neigten die Zellen dazu stattdessen in Multilayerstrukturen weiterzuwachsen. Es ist

weitgehend bekannt, dass die Proliferation nicht transformierter Zellen durch Zell-Zell-Kontakte geregelt wird. Dies wird als „Kontaktinhibition“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu zeichnen sich transformierte Zellen, durch Verlust ebendieser Kontaktinhibition aus (Kuppers et al., 2010), was auch auf SCP-1 zutrifft. Es konnte nachgewiesen werden, dass Hypoxie die Stammzeleigenschaften der Zelle erhält (Tsai et al., 2010) und der embryonale Marker hTERT durch HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxiebedingungen hochreguliert wird (Nishi et al., 2004). Da wir in dieser Studie zeigen konnten, dass SCP-1 unter Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) ihr Plateau bei 100% Zellkonfluenz erreichen, glauben wir allerdings, dass die Hypoxiebedingungen während der Zellkultur bei 2% O<sub>2</sub> für das Phänomen des Wachstumsstopps bei SCP-1 verantwortlich sind. Frühere Studien zeigten außerdem, dass bei Stammzellen, die in hohen Konfluenzraten kultiviert werden, eine höhere Wahrscheinlichkeit zu spontaner Differenzierung besteht (Ezashi et al., 2005). Dadurch, dass SCP-1 unter Hypoxiebedingungen Ihre Plateauphase früher erreichen, und nur unter Normoxiebedingungen in Multilayern weiter wachsen, ist anzunehmen, dass Hypoxie so die Wahrscheinlichkeit spontaner Differenzierung vermindert.

Zusammenfassend halten wir lentiviral mit hTERT-transfizierte SCP-1 für ein geeignetes, schnell proliferierendes Modellsystem für hMSC *in vitro*. Es ist allerdings empfehlenswert diese Zellen unter hypoxischen Bedingungen zu kultivieren, da dies dazu beiträgt, die Stammzeleigenschaften der Zellen zu erhalten und spontane Differenzierung zu verhindern.

## 4.10. Ausblick

Der Einsatz von adulten, multipotenten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) innerhalb der regenerativen Medizin weckt derzeit große Hoffnungen, dass demnächst Dank *Tissue Engineering* auch die Reparatur großer Gewebedefekte im Bereich unserer Möglichkeiten liegen wird. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass das Proliferationsverhalten von hMSCs unter geringen O<sub>2</sub>-Konzentrationen (2% O<sub>2</sub>), wie sie auch im Knochenmark herrschen, nicht beeinträchtigt wird. Sie zeigen ferner, dass die osteogene Differenzierung von hMSC durch geringe O<sub>2</sub>-Konzentrationen verhindert wird. Dieser Effekt scheint jedoch nicht ausschließlich HIF-1 $\alpha$ -bedingt zu sein, da eine Downregulation von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie nicht zu Veränderungen in der osteogenen Differenzierung führte. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass hypoxische Bedingungen dazu beitragen können, die Stammzeleigenschaften von hMSC *in vitro* zu erhalten und dass weitere zelluläre Faktoren für diesen Effekt mitverantwortlich sind. Bei der Transplantation von hMSC in Frakturwunden im Rahmen des *Tissue Engineering*, sind große Mengen an Zellen nötig. Um zu einem besseren funktionellen Ergebnis gelangen zu können, sollte die Zellkultur zur Expansion der hMSC künftig unter den für hMSC physiologischeren, hypoxischen Bedingungen erfolgen. Im Hinblick auf deren Potential, anschließend *post implantationem* die Geweberegeneration zu unterstützen, sollte dann eine optimale Versorgung der Zellen mit Sauerstoff erfolgen, da nur bei hohen Sauerstoffkonzentrationen eine adäquate osteogene Differenzierung möglich ist. In 3D-Kultursystemen lässt sich dies *in vitro* beispielsweise durch eine automatisierte Sauerstoff-getriggerte Perfusion der Bioreaktoren und zellbesiedelten *Scaffolds* mit Frischmedium erreichen (Volkmer, 2012). Generell eröffnet sich eine Reihe von Möglichkeiten in denen man sich den HIF-1 $\alpha$ -*pathway* im Rahmen der Knochenheilung zunutze machen kann. Deshalb sollte in den folgenden Schritten die Übertragung der hier gewonnenen Erkenntnisse und die Anwendung von HIF-1 $\alpha$ -Aktivatoren wie DFO an einem adäquaten *in vivo* Modell weiter untersucht werden.



## 5. Zusammenfassung

### Hintergrund:

Der aktuelle Goldstandard bei Knochentransplantationen im klinischen Alltag ist nach wie vor die autologe Knochentransplantation. Dieses Verfahren besitzt alle Voraussetzungen zu neuem Knochenwachstum, nämlich Osteokonduktivität, Osteogenität, und Osteoinduktivität. Es birgt aber eine hohe Hebedefektmorbidität. Außerdem besteht eine eingeschränkte Transplantatverfügbarkeit, welche die Anwendung im Rahmen der Wiederherstellungstherapie erschwert. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind für regenerative, zellbasierte Therapien zur Regeneration von Knochengewebe in besonderem Maße geeignet, da sie die Fähigkeit zur Selbstreplikation sowie zur Differenzierung in Knochengewebe besitzen. Allerdings unterscheiden sich die Bedingungen zwischen Monolayerkulturen *in vitro* und dem Knochenmark, als dem natürlichen Ort des Vorkommens von hMSC, im Hinblick auf Konzentrationen von Botenstoffen und dem physikalisch-chemischen Milieu beträchtlich. So herrschen unter Zellkulturbedingungen üblicherweise Sauerstoffkonzentrationen von 21% O<sub>2</sub> (sog. Normoxie). Im Knochenmark, der natürlichen Nische der hMSC, herrschen nur etwa 2% O<sub>2</sub> (sog. Hypoxie). Hypoxische Bedingungen führen zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ , einem Schlüsselgen für den Zellmetabolismus bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen. Ähnlich hypoxischen Bedingungen sind hMSC auch in Frakturen ausgesetzt. Aktuelle Studien legen nahe, dass HIF-1 $\alpha$  insbesondere im Verlauf der osteogenen Differenzierung *in vivo* eine Rolle spielen könnte.

### Zielsetzung und Fragestellung:

Vor diesem Hintergrund war es Gegenstand der hier vorgestellten Arbeit, mithilfe molekularbiologischer Techniken die Rolle von Hypoxie und HIF-1 $\alpha$ -Regulation in Bezug auf Proliferationsverhalten und osteogene Differenzierung von hMSC in der 2-D-Kultur *in vitro* unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen näher zu untersuchen.

### Material und Methoden:

Hierzu wurden hMSC unter Normoxiebedingungen bei 21% O<sub>2</sub>, unter Hypoxiebedingungen bei 2% O<sub>2</sub> im Hypoxieinkubator, und unter Anoxiebedingungen

bei 0% O<sub>2</sub> im Anaerojar kultiviert. Die dabei herrschenden Sauerstoffkonzentrationen wurden mit fluorimetrischer Sauerstoffmessung bestimmt, der Zustand zellulärer Hypoxie mittels Pimonidazolfärbung nachgewiesen. HIF-1α wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erfolgreich dargestellt. Mittels siRNA-Technik wurde HIF-1α unter Hypoxiebedingungen herabreguliert und mittels Desferrioxamin (DFO) bei Normoxiebedingungen stabilisiert. Anschließend wurde der Einfluss von Hypoxie sowie der Hoch- und Niederregulation von HIF-1α auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von hMSC *in vitro* beobachtet. Der Erfolg der osteogenen Differenzierung wurde mit quantitativer Alizarin-Rot-Färbung ermittelt.

#### Ergebnisse:

Der Zustand zellulärer Hypoxie konnte mit den verwendeten Methoden jederzeit vollständig gewährleistet werden. Wir konnten zeigen, dass sich die Proliferationsraten von hMSC unter Hypoxiebedingungen von 2% O<sub>2</sub> analog zu den Proliferationsraten unter Normoxiebedingungen verhalten und Hypoxie von 2% O<sub>2</sub> keinerlei zytotoxische Effekte auf die Zellen hat. Wir konnten nachweisen, dass die mRNA-Expression von HIF-1α *in vitro* unabhängig von den jeweiligen Sauerstoffkonzentrationen in der Zellkultur und der Dauer des Sauerstoffentzugs ist. Unter Anoxie und Hypoxie ließ sich reichlich HIF-1α-Protein im Kernkompartiment der Zellen darstellen. Unter Normoxiebedingungen war HIF-1α-Protein nicht nachweisbar. Ein Knock-Down-Effekt von HIF-1α mittels siRNA-Technik ließ sich auf mRNA- und Proteinebene über einen Zeitraum von 72 Stunden nachweisen. Die künstliche Downregulation führte hierbei ebenfalls zu einer sekundären Minderexpression des HIF-1α-*Downstream-Targets* VEGF. Pharmakologisch ließ sich HIF-1α-Protein durch Applikation des Eisenchelators DFO unter Normoxiebedingungen stabilisieren. Im *in vitro*-Differenzierungsversuch zeigte sich, dass Hypoxie von 2% O<sub>2</sub> die osteogene Differenzierung verhindert. Eine dauerhafte Stabilisierung von HIF-1α während der osteogenen Differenzierung mit 100μmol DFO unter Normoxiebedingungen führte dagegen im *in vitro* Versuch zum Absterben der hMSC. Unter reinen Normoxiebedingungen (21% O<sub>2</sub>) fand eine ausgeprägte osteogene Differenzierung mit reichlich Matrixdeposition statt. Der wiederholte Knock-Down von HIF-1α während der osteogenen Differenzierung unter

Hypoxiebedingungen (2% O<sub>2</sub>) führte zu keinen Einschränkungen hinsichtlich der Zellproliferation, zeigte jedoch keine nachweisbare Matrixdeposition.

Konklusion:

1. Hypoxieinkubatoren und Zellkultur im Anaerojar stellen geeignete Maßnahmen dar, um verlässlich hypoxische bzw. anoxische Verhältnisse in der Zellkultur zu erzeugen.
2. Kultur unter Hypoxiebedingungen von 2% O<sub>2</sub> hat keinerlei Einfluss auf das Proliferationsverhalten von hMSC.
3. Die mRNA-Expression von HIF-1 $\alpha$  *in vitro* ist unabhängig von der jeweils anliegenden O<sub>2</sub>-Konzentration in der Zellkultur und der Dauer des Sauerstoffentzugs.
4. Auf Proteinebene lässt sich der HIF-1 $\alpha$ -Transkriptionsfaktor in unbehandelten hMSC nur bei hypoxischen Zellen, und ausschließlich im Kernkompartiment nachweisen.
5. Die Anwendung von siRNA stellt eine geeignete Methode für einen temporären HIF-1 $\alpha$ -Knock-Down dar, und führt zur konsekutiven Minderexpression des HIF-1 $\alpha$ - *Downstream-Targets* VEGF.
6. Die kurzfristige Applikation von DFO ist geeignet um HIF-1 $\alpha$ -Protein unter Normoxiebedingungen zu stabilisieren.
7. Die Verhinderung der osteogenen Differenzierung durch hypoxische Verhältnisse, wie sie auch im Knochenmark, dem Ort des natürlichen Vorkommens von hMSC herrschen, legt nahe, dass Hypoxie dazu beiträgt den Stammzellcharakter der hMSC zu erhalten und dass weitere zelluläre Faktoren für diesen Effekt mitverantwortlich sind.

Ausblick:

In dem hier vorgestellten Projekt war es Ziel mithilfe molekularbiologischer Techniken die Rolle von Hypoxie und HIF-1 $\alpha$ -Regulation in Bezug auf die osteogene Differenzierung unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in der 2-D-Kultur *in vitro* näher zu beleuchten. Es zeigte sich dabei, dass Hypoxie die Proliferationseigenschaften der hMSC nicht beeinflusst, aber deren osteogene

Differenzierung verhindert. Dies legt nahe, dass hypoxische Bedingungen dazu beitragen können, die Stammzeleigenschaften von hMSC *in vitro* zu erhalten und dass weitere zelluläre Faktoren für diesen Effekt mitverantwortlich sind. Da für die Implantation von hMSC im Rahmen von *Tissue Engineering* große Mengen an Zellen nötig sind, sollte die Expansion der Osteoprogenitorzellen unter den für sie physiologischeren, hypoxischen Bedingungen erfolgen. Da *post implantationem* nur bei hohen Sauerstoffkonzentrationen eine adäquate osteogene Differenzierung möglich ist, erschließen sich hier Möglichkeiten in denen man sich die Kenntnisse dieser Studie zur pharmakologischen HIF-1 $\alpha$ -Hochregulation für die Knochenheilung *in vivo* zunutze machen kann. Der HIF-1 $\alpha$ -*pathway* ist im Rahmen der Knochenheilung ein entscheidender Mediator der zur Knochenneubildung nötigen Neoangiogenese. Klinisch kann hier die Anwendung von HIF-1 $\alpha$ -Aktivatoren zu verbesserter Knochenheilung führen.

## 6. Summary

The current gold standard of bone grafts is the autograft since it possesses all the characteristics necessary for new bone growth, namely osteoconductivity, osteogenicity and osteoinductivity. However, the autograft has its limitations, including donor-site morbidity and limited supply. *Tissue engineering* of bone is a promising method to generate bone substitutes using metabolically active cells. Human mesenchymal stem cells (hMSC) are suitable for cell based therapies to regenerate bone tissue, as the cells maintain a high self-renewing potential and because they differentiate along the osteogenic lineage, if stimulated accordingly. Yet, physico-chemical conditions between monolayer-cultures *in vitro* (21% oxygen, normoxia) and bone marrow as the natural niche of hMSC (2-5% oxygen, hypoxia) differ widely. In the site of fracture, hMSC are also exposed to similar hypoxia. Hypoxic conditions result in stabilization of *Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ), a key transcription factor, regulating metabolism under hypoxic conditions. Recent studies suggested that HIF-1 $\alpha$ , may play a role in the process of osteogenic differentiation *in vivo*. Therefore, the goal of this study was to assess the impact of Hypoxia and HIF-1 $\alpha$ -regulation on proliferation and osteogenic differentiation of hMSC *in vitro*.

hMSCs were cultured under conditions of 21% O<sub>2</sub> (normoxia), 2% O<sub>2</sub> (hypoxia) and 0% O<sub>2</sub> (anoxia). The oxygen content was continuously detected by fluorimetric oxygen measurement. HIF-1 $\alpha$  was downregulated by silencing RNA technique in hypoxia, or stabilized with desferrioxamine (DFO) in normoxia, and subsequently prepared on mRNA- as well as on protein level. The rate of osteogenic differentiation was measured by quantitative Alizarin-Red-Staining.

Our results show that proliferation of hMSC is not impaired by low oxygen concentrations (2% oxygen), whereas hypoxia inhibits the osteogenic differentiation of hMSC. HIF-1 $\alpha$ -downregulation did not change osteogenic differentiation under hypoxic conditions. We were able to demonstrate that mRNA-expression of HIF-1 $\alpha$  is independent of the oxygen concentrations used *in vitro*. Within hypoxic cells HIF-1 $\alpha$ -protein was detectable abundantly, whereas HIF-1 $\alpha$ -protein was decomposed rapidly under normoxic conditions. Our results show that hypoxia might contribute to maintain the stem cell properties in hMSC, and that further cellular factors are responsible for these effects, too.

#### Outlook:

The aim of the present study was to determine the role of hypoxia and HIF-1 $\alpha$ -regulation in regard to proliferation and osteogenic differentiation of hMSC under normoxic and hypoxic conditions, in 2-D culture *in vitro*, using means of molecular biology. We showed that hypoxic culturing does not alter the proliferation characteristics of hMSC, but successfully inhibits their differentiation along the osteogenic lineage. This suggests that hypoxic conditions can contribute to the maintaining of stem cell characteristics in hMSC *in vitro*, and that further cellular factors are responsible for this effects, too. As huge amounts of cells are needed for tissue engineering applications, the expansion of these osteoprogenitorcells should take place in hypoxic conditions, as these are more physiologic for hMSC. After implantation of those expanded osteoprogenitorcells to the site of fracture, osteogenic differentiation requires an adequate supply of oxygen. In this respect we can use the knowledge of this study concerning the pharmacological upregulation of the HIF-1 $\alpha$ -pathway. The HIF-1 $\alpha$ -pathway is a critical mediator of neoangiogenesis required for skeletal regeneration, thus suggesting the application of HIF-1 $\alpha$ -activators in therapies to improve bone healing.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Arkudas,A., J.P.Beier, K.Heidner, J.Tjiawi, E.Polykandriotis, S.Srouf, M.Sturzl, R.E.Horch, and U.Kneser. 2007. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng* 13:1549-1560.
2. Banfi,A., A.Muraglia, B.Dozin, M.Mastrogiacomo, R.Cancedda, and R.Quarto. 2000. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp. Hematol.* 28:707-715.
3. Baxter,M.A., R.F.Wynn, S.N.Jowitt, J.E.Wraith, L.J.Fairbairn, and I.Bellantuono. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22:675-682.
4. Beltrami,A.P., D.Cesselli, N.Bergamin, P.Marcon, S.Rigo, E.Puppato, F.D'Aurizio, R.Verardo, S.Piazza, A.Pignatelli, A.Poz, U.Baccarani, D.Damiani, R.Fanin, L.Mariuzzi, N.Finato, P.Masolini, S.Burelli, O.Belluzzi, C.Schneider, and C.A.Beltrami. 2007. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110:3438-3446.
5. Ben Shoshan,J., S.Schwartz, G.Luboshits, S.Maysel-Auslender, A.Barzelay, S.Polak-Charcon, E.Tzahor, I.Barshack, A.Barak, H.Levkovitch-Verbin, G.Keren, and J.George. 2008. Constitutive expression of HIF-1alpha and HIF-2alpha in bone marrow stromal cells differentially promotes their proangiogenic properties. *Stem Cells* 26:2634-2643.
6. Bernstein,P., M.Bornhauser, K.P.Gunther, and M.Stiehler. 2009. [Bone tissue engineering in clinical application : assessment of the current situation.]. *Orthopade* 38:1029-1037.
7. Bianchi,L., L.Tacchini, and G.Cairo. 1999. HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Res.* 27:4223-4227.
8. Bielby,R.C., A.R.Boccaccini, J.M.Polak, and L.D.Buttery. 2004. In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 10:1518-1525.
9. Blum B, and Benvenisty N. 2008. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res.* 2008;100:133-58 100:133-158.
10. Böcker,W., Z.Yin, I.Drosse, F.Haasters, O.Rossmann, M.Wierer, C.Popov, M.Locher, W.Mutschler, D.Docheva, and M.Schieker. 2008. Introducing

a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *J. Cell Mol. Med.*

11. Bodnar,A.G., M.Ouellette, M.Frolkis, S.E.Holt, C.P.Chiu, G.B.Morin, C.B.Harley, J.W.Shay, S.Lichtsteiner, and W.E.Wright. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
12. Bruder,S.P., N.Jaiswal, and S.E.Haynesworth. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.* 64:278-294.
13. Bruick,R.K. 2000. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:9082-9087.
14. Carrancio,S., N.Lopez-Holgado, F.M.Sanchez-Guijo, E.Villaron, V.Barbado, S.Tabera, M.Diez-Campelo, J.Blanco, J.F.San Miguel, and M.C.Del Canizo. 2008. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp. Hematol.* 36:1014-1021.
15. Castillo,A.B., andC.R.Jacobs. 2010. Mesenchymal stem cell mechanobiology. *Curr. Osteoporos. Rep.* 8:98-104.
16. Ceradini,D.J., A.R.Kulkarni, M.J.Callaghan, O.M.Tepper, N.Bastidas, M.E.Kleinman, J.M.Capla, R.D.Galiano, J.P.Levine, and G.C.Gurtner. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* 10:858-864.
17. Choi, J. R., B. Pinguan-Murphy, W. A. Wan Abas, M. A. Noor Azmi, S. Z. Omar, K. H. Chua and W. K. Wan Safwani. 2014. "Impact of Low Oxygen Tension on Stemness, Proliferation and Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells." *Biochem Biophys Res Commun* 448, no. 2: 218-24.
18. Chung,D.J., K.Hayashi, C.A.Toupadakis, A.Wong, and C.E.Yellowley. 2010. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. *Res. Vet. Sci.*
19. Ciapetti,G., L.Ambrosio, G.Marletta, N.Baldini, and A.Giunti. 2006. Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials* 27:6150-6160.
20. Cipolleschi,M.G., S.P.Dello, and M.Olivotto. 1993. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82:2031-2037.
21. Cohen,M.M., Jr. 2006. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates  
1. *Am. J. Med. Genet. A* 140:2646-2706.

22. Cowan,C.M., Y.Y.Shi, O.O.Aalami, Y.F.Chou, C.Mari, R.Thomas, N.Quarto, C.H.Contag, B.Wu, and M.T.Longaker. 2004. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat. Biotechnol.* 22:560-567.
23. D'Ippolito,G., S.Diabira, G.A.Howard, B.A.Roos, and P.C.Schiller. 2006. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone* 39:513-522.
24. De Long,W.Jr., T.A.Einhorn, K.Koval, M.McKee, W.Smith, R.Sanders, and T.Watson. 2007. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 89:649-658.
25. 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.* 107:275-281.
26. 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.* 8:315-317.
27. Drosse,I., E.Volkmer, R.Capanna, P.De Biase, W.Mutschler, and M.Schieker. 2008. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 39 Suppl 2:S9-20.
28. Einhorn,T.A. 2005. The science of fracture healing. *J. Orthop. Trauma* 19:S4-S6.
29. Einhorn,T.A., C.T.Laurencin, and K.Lyons. 2008. An AAOS-NIH symposium. Fracture repair: challenges, opportunities, and directions for future research. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90:438-442.
30. Eriksen,E.F. 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 11:219-227.
31. Ezashi,T., P.Das, and R.M.Roberts. 2005. Low O2 tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:4783-4788.
32. Fehrer,C., R.Brunauer, G.Laschober, H.Unterluggauer, S.Reitinger, F.Kloss, C.Gully, R.Gassner, and G.Lepperdinger. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6:745-757.
33. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil,I., M.A.Alobera-Gracia, M.Canto-Pingarron, and L.Blanco-Jerez. 2006a. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 11:E47-E51.



34. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil,I., M.A.Alobera-Gracia, M.Canto-Pingarron, and L.Blanco-Jerez. 2006b. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 11:E151-E157.
35. Flores,I., M.L.Cayuela, and M.A.Blasco. 2005. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. *Science* 309:1253-1256.
36. Forsythe,J.A., B.H.Jiang, N.V.Iyer, F.Agani, S.W.Leung, R.D.Koos, and G.L.Semenza. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* 16:4604-4613.
37. Fotia, C., A. Massa, F. Boriani, N. Baldini and D. Granchi. 2015. "Prolonged Exposure to Hypoxic Milieu Improves the Osteogenic Potential of Adipose Derived Stem Cells." *J Cell Biochem.*
38. Gaston,M.S., andA.H.Simpson. 2007. Inhibition of fracture healing. *J. Bone Joint Surg. Br.* 89:1553-1560.
39. Giannoudis,P.V., T.A.Einhorn, and D.Marsh. 2007. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38 Suppl 4:S3-S6.
40. Goldring CE, Duffy PA, Benvenisty N, Andrews PW, Ben-David U, Eakins R, French N, Hanley NA, Kelly L, Kitteringham NR, Kurth J, Ladenheim D, Lavery H, McBlane J, Narayanan G, Patel S, Reinhardt J, Rossi A, Sharpe M, and Park BK. 2011. Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* 8(6):618-628.
41. Grayson,W.L., F.Zhao, B.Bunnell, and T.Ma. 2007. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358:948-953.
42. Grayson,W.L., F.Zhao, R.Izadpanah, B.Bunnell, and T.Ma. 2006. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J. Cell Physiol* 207:331-339.
43. Guo,M., L.P.Song, Y.Jiang, W.Liu, Y.Yu, and G.Q.Chen. 2006. Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. *Apoptosis.* 11:67-77.
44. Haasters,F., W.C.Prall, D.Anz, C.Bourquin, C.Pautke, S.Endres, W.Mutschler, D.Docheva, and M.Schieker. 2009. Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing. *J. Anat.* 214:759-767.
45. Han,Y., S.C.Cowin, M.B.Schaffler, and S.Weinbaum. 2004. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:16689-16694.

46. Henne-Bruns D., Düring M., and Kremer B. 2007. Chirurgie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
47. Hidaka, C., M.E. Cunningham, S.A. Rodeo, S.A. Maher, and W. Zhu. 2006. Modern biologics used in orthopaedic surgery. *Curr. Opin. Rheumatol.* 18:74-79.
48. Hing, K.A. 2004. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* 362:2821-2850.
49. Holzwarth, C., M. Vaegler, F. Gieseke, S.M. Pfister, R. Handgretinger, G. Kerst, and I. Müller. 2010. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC. Cell Biol.* 11:11.
50. Hung, S.C., R.R. Pochampally, S.C. Hsu, C. Sanchez, S.C. Chen, J. Spees, and D.J. Prockop. 2007. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS. One.* 2:e416.
51. Iida, K., T. Takeda-Kawaguchi, Y. Tezuka, T. Kunisada, T. Shibata, and K. Tezuka. 2010. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch. Oral Biol.* 55:648-654.
52. Iyer, N.V., L.E. Kotch, F. Agani, S.W. Leung, E. Laughner, R.H. Wenger, M. Gassmann, J.D. Gearhart, A.M. Lawler, A.Y. Yu, and G.L. Semenza. 1998. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12:149-162.
53. Jäger, M., P. Hernigou, C. Zilkens, M. Herten, J. Fischer, and R. Krauspe. 2010. [Cell therapy in bone-healing disorders]. *Orthopade* 39:449-462.
54. Jäger, M., B. Westhoff, A. Wild, and R. Krauspe. 2005. [Bone harvesting from the iliac crest]. *Orthopade* 34:976-90, 992.
55. Jiang, Y., B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes, and C.M. Verfaillie. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30:896-904.
56. Jun, E.S., T.H. Lee, H.H. Cho, S.Y. Suh, and J.S. Jung. 2004. Expression of telomerase extends longevity and enhances differentiation in human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol Biochem.* 14:261-268.
57. Karner, E., C.M. Backesjo, J. Cedervall, R.V. Sugars, L. Ahrlund-Richter, and M. Wendel. 2009. Dynamics of gene expression during bone matrix formation in osteogenic cultures derived from human embryonic stem cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1790:110-118.
58. Karner, E., C. Unger, A.J. Sloan, L. Ahrlund-Richter, R.V. Sugars, and M. Wendel. 2007. Bone matrix formation in osteogenic cultures derived from human embryonic stem cells in vitro. *Stem Cells Dev.* 16:39-52.

59. Kassem,M. 2006. Stem cells: potential therapy for age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067:436-442.
60. Ke,Q., andM.Costa. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* 70:1469-1480.
61. Keramaris,N.C., G.M.Calori, V.S.Nikolaou, E.H.Schemitsch, and P.V.Giannoudis. 2008. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 39 Suppl 2:S45-S57.
62. Khan,Y., M.J.Yaszemski, A.G.Mikos, and C.T.Laurencin. 2008. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90 Suppl 1:36-42.
63. Kirker-Head,C., V.Karageorgiou, S.Hofmann, R.Fajardo, O.Betz, H.P.Merkle, M.Hilbe, B.von Rechenberg, J.McCool, L.Abrahamsen, A.Nazarian, E.Cory, M.Curtis, D.Kaplan, and L.Meinel. 2007. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone* 41:247-255.
64. Kneser,U., D.J.Schaefer, E.Polykandriotis, and R.E.Horch. 2006. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J. Cell Mol. Med.* 10:7-19.
65. Kuhn,N.Z., andR.S.Tuan. 2010. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J. Cell Physiol* 222:268-277.
66. Kuppers,M., C.Ittrich, D.Faust, and C.Dietrich. 2010. The transcriptional programme of contact-inhibition. *J. Cell Biochem.* 110:1234-1243.
67. Kuznetsov,S.A., M.H.Mankani, S.Gronthos, K.Satomura, P.Bianco, and P.G.Robey. 2001. Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* 153:1133-1140.
68. Langer,R., andJ.P.Vacanti. 1993. Tissue engineering. *Science* 260:920-926.
69. Laurencin,C., Y.Khan, and S.F.El Amin. 2006. Bone graft substitutes. *Expert. Rev. Med. Devices* 3:49-57.
70. Lee, J. S., J. C. Park, T. W. Kim, B. J. Jung, Y. Lee, E. K. Shim, S. Park, E. Y. Choi, K. S. Cho and C. S. Kim. 2015. "Human Bone Marrow Stem Cells Cultured under Hypoxic Conditions Present Altered Characteristics and Enhanced in Vivo Tissue Regeneration." *Bone*.
71. Lee,R.H., B.Kim, I.Choi, H.Kim, H.S.Choi, K.Suh, Y.C.Bae, and J.S.Jung. 2004. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 14:311-324.
72. Lefebvre,V., andP.Bhattaram. 2010. Vertebrate skeletogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 90:291-317.

73. Lennon,D.P., J.M.Edmison, and A.I.Caplan. 2001. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *J. Cell Physiol* 187:345-355.
74. Levi,B., A.W.James, E.R.Nelson, D.Vistnes, B.Wu, M.Lee, A.Gupta, and M.T.Longaker. 2010. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS. One.* 5:e11177.
75. Liechty,K.W., T.C.MacKenzie, A.F.Shaaban, A.Radu, A.M.Moseley, R.Deans, D.R.Marshak, and A.W.Flake. 2000. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med.* 6:1282-1286.
76. Lind,M., andC.Bunger. 2001. Factors stimulating bone formation. *Eur. Spine J.* 10 Suppl 2:S102-S109.
77. Liu,X.H., A.Kirschenbaum, S.Yao, and A.C.Levine. 2005. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* 146:1991-1998.
78. Lopez,M.J., andN.D.Spencer. 2011. In Vitro Adult Rat Adipose Tissue-Derived Stromal Cell Isolation and Differentiation. *Methods Mol. Biol.* 702:37-46.
79. Ma,T., W.L.Grayson, M.Frohlich, and G.Vunjak-Novakovic. 2009. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol. Prog.* 25:32-42.
80. Malda,J., T.J.Klein, and Z.Upton. 2007. The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Eng* 13:2153-2162.
81. Malladi,P., Y.Xu, M.Chiou, A.J.Giaccia, and M.T.Longaker. 2007. Hypoxia inducible factor-1alpha deficiency affects chondrogenesis of adipose-derived adult stromal cells. *Tissue Eng* 13:1159-1171.
82. Mangiavini, L., C. Merceron, E. Araldi, R. Khatri, R. Gerard-O'Riley, T. L. Wilson, E. B. Rankin, A. J. Giaccia and E. Schipani. 2014. "Loss of Vhl in Mesenchymal Progenitors of the Limb Bud Alters Multiple Steps of Endochondral Bone Development." *Dev Biol* 393, no. 1: 124-36.
83. McKibbin,B. 1978. The biology of fracture healing in long bones. *J. Bone Joint Surg. Br.* 60-B:150-162.
84. Mihara,K., C.Imai, E.Coustan-Smith, J.S.Dome, M.Dominici, E.Vanin, and D.Campana. 2003. Development and functional characterization of human bone marrow mesenchymal cells immortalized by enforced expression of telomerase. *Br. J. Haematol.* 120:846-849.
85. Mowat,F.M., U.F.Luhmann, A.J.Smith, C.Lange, Y.Duran, S.Harten, D.Shukla, P.H.Maxwell, R.R.Ali, and J.W.Bainbridge. 2010. HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially activated in distinct cell populations in retinal ischaemia. *PLoS. One.* 5:e11103.

86. Nagano, M., K. Kimura, T. Yamashita, K. Ohneda, D. Nozawa, H. Hamada, H. Yoshikawa, N. Ochiai, and O. Ohneda. 2010. Hypoxia responsive mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood are effective for bone repair. *Stem Cells Dev.* 19:1195-1210.
87. Nakahara, H., H. Misawa, T. Hayashi, E. Kondo, T. Yuasa, Y. Kubota, M. Seita, H. Kawamoto, W. A. Hassan, R. A. Hassan, S. M. Javed, M. Tanaka, H. Endo, H. Noguchi, S. Matsumoto, K. Takata, Y. Tashiro, S. Nakaji, T. Ozaki, and N. Kobayashi. 2009. Bone repair by transplantation of hTERT-immortalized human mesenchymal stem cells in mice. *Transplantation* 88:346-353.
88. Nakashima, K., and B. de Crombrughe. 2003. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* 19:458-466.
89. Nakayama, K., I. J. Frew, M. Hagensen, M. Skals, H. Habelhah, A. Bhoumik, T. Kadoya, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P. B. Frappell, D. D. Bowtell, and Z. Ronai. 2004. Siah2 regulates stability of prolyl-hydroxylases, controls HIF1alpha abundance, and modulates physiological responses to hypoxia. *Cell* 117:941-952.
90. Navarro, M., A. Michiardi, O. Castano, and J. A. Planell. 2008. Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* 5:1137-1158.
91. Niethard F. U., Pfeil J., and Biberthaler P. 2009. Orthopädie und Unfallchirurgie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
92. Nishi, H., T. Nakada, S. Kyo, M. Inoue, J. W. Shay, and K. Isaka. 2004. Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol. Cell Biol.* 24:6076-6083.
93. Olivier, V., N. Fauchoux, and P. Hardouin. 2004. Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery. *Drug Discov. Today* 9:803-811.
94. Otto, W. R., and J. Rao. 2004. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif.* 37:97-110.
95. Parsch, D., J. Fellenberg, T. H. Brummendorf, A. M. Eschlbeck, and W. Richter. 2004. Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. *J. Mol. Med.* 82:49-55.
96. Peng, H., and J. Huard. 2004. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl. Immunol.* 12:311-319.
97. Phillips, A. M. 2005. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36 Suppl 3:S5-S7.
98. Pientka, L. 2004. [Hip fractures (osteoporosis) and geriatric rehabilitation]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* 47:547-553.

99. 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* 284:143-147.
100. Polykandriotis, E., A. Arkudas, S. Euler, J.P. Beier, R.E. Horch, and U. Kneser. 2006. [Prevascularisation strategies in tissue engineering]. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir* 38:217-223.
101. Potier, E., E. Ferreira, R. Andriamanalijaona, J.P. Pujol, K. Oudina, D. Logeart-Avramoglou, and H. Petite. 2007. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 40:1078-1087.
102. Prockop, D.J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
103. Ren, H., Y. Cao, Q. Zhao, J. Li, C. Zhou, L. Liao, M. Jia, Q. Zhao, H. Cai, Z.C. Han, R. Yang, G. Chen, and R.C. Zhao. 2006. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347:12-21.
104. Rolfs, A., I. Kvietikova, M. Gassmann, and R.H. Wenger. 1997. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 272:20055-20062.
105. Salim, A., R.P. Nacamuli, E.F. Morgan, A.J. Giaccia, and M.T. Longaker. 2004. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 279:40007-40016.
106. Schaffler, A., and C. Buchler. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25:818-827.
107. Schallmoser, K., C. Bartmann, E. Rohde, S. Bork, C. Guelly, A.C. Obenauf, A. Reinisch, P. Horn, A.D. Ho, D. Strunk, and W. Wagner. 2010. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica* 95:867-874.
108. Schieker, M., H. Gulkan, B. Austrup, P. Neth, and W. Mutschler. 2004. [Telomerase activity and telomere length of human mesenchymal stem cells. Changes during osteogenic differentiation]. *Orthopade* 33:1373-1377.
109. Schieker, M., C. Heiss, and W. Mutschler. 2008. [Bone substitutes]. *Unfallchirurg* 111:613-619.
110. Schieker, M., and W. Mutschler. 2006. [Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]. *Unfallchirurg* 109:715-732.
111. Schofield, R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4:7-25.

112. Seeman,E., andP.D.Delmas. 2006. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N. Engl. J. Med.* 354:2250-2261.
113. Seitz,S., K.Ern, G.Lamper, D.Docheva, I.Drosse, S.Milz, W.Mutschler, and M.Schieker. 2007. Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation. *Tissue Eng* 13:1059-1067.
114. Semenza,G.L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:588-594.
115. Semenza,G.L. 1999. Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15:551-578.
116. Semenza,G.L. 2000. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14:1983-1991.
117. Semenza,G.L. 2004. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology.* (Bethesda. ) 19:176-182.
118. Semenza,G.L., M.K.Nejfelt, S.M.Chi, and S.E.Antonarakis. 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:5680-5684.
119. Semenza,G.L., P.H.Roth, H.M.Fang, and G.L.Wang. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269:23757-23763.
120. Sendoel,A., I.Kohler, C.Fellmann, S.W.Lowe, and M.O.Hengartner. 2010. HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase. *Nature* 465:577-583.
121. Shi,S., S.Gronthos, S.Chen, A.Reddi, C.M.Counter, P.G.Robey, and C.Y.Wang. 2002. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat. Biotechnol.* 20:587-591.
122. Shomento,S.H., C.Wan, X.Cao, M.C.Faugere, M.L.Bouxsein, T.L.Clemens, and R.C.Riddle. 2010. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha exert both distinct and overlapping functions in long bone development. *J. Cell Biochem.* 109:196-204.
123. Simonsen,J.L., C.Rosada, N.Serakinci, J.Justesen, K.Stenderup, S.I.Rattan, T.G.Jensen, and M.Kassem. 2002. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat. Biotechnol.* 20:592-596.
124. Simsek,T., F.Kocabas, J.Zheng, R.J.Deberardinis, A.I.Mahmoud, E.N.Olson, J.W.Schneider, C.C.Zhang, and H.A.Sadek. 2010. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 7:380-390.

125. Slater, B.J., M.D.Kwan, D.M.Gupta, N.J.Panetta, and M.T.Longaker. 2008. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 8:885-893.
126. Smith, L.L., H.A.Coller, and J.M.Roberts. 2003. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* 5:474-479.
127. Stenderup, K., J.Justesen, C.Clausen, and M.Kassem. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33:919-926.
128. Tomford, W.W. 2000. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank.* 1:105-109.
129. Tremoleda, J.L., N.R.Forsyth, N.S.Khan, D.Wojtacha, I.Christodoulou, B.J.Tye, S.N.Racey, S.Collishaw, V.Sottile, A.J.Thomson, A.H.Simpson, B.S.Noble, and J.McWhir. 2008. Bone tissue formation from human embryonic stem cells in vivo. *Cloning Stem Cells* 10:119-132.
130. Tsai, C.C., Y.J.Chen, T.L.Yew, L.L.Chen, J.Y.Wang, C.H.Chiu, and S.C.Hung. 2010. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through downregulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood*.
131. Utting, J.C., A.M.Flanagan, A.Brandao-Burch, I.R.Orriss, and T.R.Arnett. 2010. Hypoxia stimulates osteoclast formation from human peripheral blood. *Cell Biochem. Funct.* 28:374-380.
132. Vacanti, C.A. 2006. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng* 12:1137-1142.
133. Volkmer, E. 2012. Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone in vitro using an automated, oxygen-triggered feedback loop. *J Mater Sci Mater Med.*
134. Volkmer, E., I.Drosse, S.Otto, A.Stangelmayer, M.Stengele, B.C.Kallukalam, W.Mutschler, and M.Schieker. 2008. Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone. *Tissue Eng Part A* 14:1331-1340.
135. Volkmer, E., B.C.Kallukalam, J.Maertz, S.Otto, I.Drosse, H.Polzer, W.Böcker, M.Stengele, D.Docheva, W.Mutschler, and M.Schieker. 2010. Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Tissue Eng Part A* 16:153-164.
136. Wan, C., S.R.Gilbert, Y.Wang, X.Cao, X.Shen, G.Ramaswamy, K.A.Jacobsen, Z.S.Alaql, A.W.Eberhardt, L.C.Gerstenfeld, T.A.Einhorn, L.Deng, and T.L.Clemens. 2008. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:686-691.



137. Wan,C., J.Shao, S.R.Gilbert, R.C.Riddle, F.Long, R.S.Johnson, E.Schipani, and T.L.Clemens. 2010. Role of HIF-1alpha in skeletal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192:322-326.
138. Wang,G.L., B.H.Jiang, E.A.Rue, and G.L.Semenza. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:5510-5514.
139. Wang,G.L., andG.L.Semenza. 1993. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood* 82:3610-3615.
140. Wang,Y., C.Wan, L.Deng, X.Liu, X.Cao, S.R.Gilbert, M.L.Bouxsein, M.C.Faugere, R.E.Guldberg, L.C.Gerstenfeld, V.H.Haase, R.S.Johnson, E.Schipani, and T.L.Clemens. 2007. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J. Clin. Invest* 117:1616-1626.
141. Wenger,R.H., A.Rolfs, H.H.Marti, J.L.Guenet, and M.Gassmann. 1996. Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223:54-59.
142. Xenaki,G., T.Ontikatzte, R.Rajendran, I.J.Stratford, C.Dive, M.Krstic-Demonacos, and C.Demonacos. 2008. PCAF is an HIF-1alpha cofactor that regulates p53 transcriptional activity in hypoxia. *Oncogene* 27:5785-5796.
143. Ytrehus,K. 2008. Hypoxia-inducible factor 1 alpha: a new piece in the preconditioning puzzle. *Cardiovasc. Res.* 77:443-444.
144. Zhang,P., Y.Wang, Y.Hui, D.Hu, H.Wang, J.Zhou, and H.Du. 2007. Inhibition of VEGF expression by targeting HIF-1 alpha with small interference RNA in human RPE cells. *Ophthalmologica* 221:411-417.
145. Zhao,T., C.P.Zhang, Z.H.Liu, L.Y.Wu, X.Huang, H.T.Wu, L.Xiong, X.Wang, X.M.Wang, L.L.Zhu, and M.Fan. 2008. Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells--role of hypoxia-inducible transcription factor-1alpha. *FEBS J.* 275:1824-1834.
146. Zhou, N., N. Hu, J. Y. Liao, L. B. Lin, C. Zhao, W. K. Si, Z. Yang, S. X. Yi, T. X. Fan, W. Bao, X. Liang, X. Wei, H. Chen, C. Chen, Q. Chen, X. Lin and W. Huang. 2015. "Hif-1alpha as a Regulator of Bmp2-Induced Chondrogenic Differentiation, Osteogenic Differentiation, and Endochondral Ossification in Stem Cells." *Cell Physiol Biochem* 36, no. 1: 44-60.
147. Zimmermann,S., M.Voss, S.Kaiser, U.Kapp, C.F.Waller, and U.M.Martens. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 17:1146-1149.

148. 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* 7:211-228.

## Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MEM	Minimal Essential Medium alpha
$\Delta$ HIF-1 $\alpha$ -Maus	HIF-1 $\alpha$ -defiziente Maus
$\Delta$ VHL-Maus	VHL-defiziente Maus
ALP	Alkalische Phosphatase
AMV	Aviärer Myeloblastosis-Virus
AT-cMSC	Adipose Tissue derived canine Mesenchymal Stem Cell
bHLH-PAS	helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim
BID	BH3 interacting domain death agonist
BMP	Bone Morphogenic Protein
BMSC	Bone Marrow Stromal Cell
cDNA	komplementäre DNA
CFU	Colony-Forming-Unit
CFU-F	Colony-Forming-Unit-Fibroblast
cMSC	canine Mesenchymal Stem Cell
COL I	Kollagen Typ I
DFO	Desferrioxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
EPO	Erythropoietin
ES	Embryonale Stammzellen
ExperiMed	Labor für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt, Klinikum der Universität München
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
hDPC	human Dental Pulp Cells
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor-1 alpha
HIF-1 $\beta$	Hypoxia-Inducible-Factor-1-beta
HIF-2 $\alpha$	Hypoxia-Inducible-Factor-2 alpha
hMSC	human Mesenchymal Stem Cell
HRE	Hypoxia-Responsive-Element
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
hTERT	human Telomerase Reverse Transcriptase
IL-6	Interleukin 6
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LDH	Laktatdehydrogenase

---

MAPK	Map-Kinase
MC3T3	murine Osteoprogenitorzellen
mRNA	Messenger-RNA
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
ODDD	Oxygen Dependent Degradation Domain
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCAF	K(lysine) acetyltransferase 2B
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE2	Prostaglandin E2
PHD	Prolyhydroxylase
PVDF	Polyvinylfluoridmembran
pVHL	Von Hippel-Lindau-Protein
RANK-L	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
RS-Cell	Rapidly-Selfrenewing Cell
RT	Reverse Transkription
rt-PCR	reverse transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction
RUNX2	RUNT Related Protein 2
SCP-1	Single Cell Picked Clone-1
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor-1
SDR	Sensor Dish Reader
siRNA	silencing-RNA
TBST	Tris-Pufferlösung mit 0,05% Tween-20
TE	Tissue Engineering
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel Lindau-Protein

## Danksagung

Herrn Professor Dr. Wolf Mutschler danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit aus dem Rahmen des FöFoLe-Programms (Förderung für Forschung und Lehre) an die humanmedizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Professor Dr. Matthias Schieker bedanke ich mich für die wegweisenden Ratschläge und seine umfangreiche Förderung, die weit über die Betreuung einer Doktorarbeit hinausging und noch immer geht, sowie für die freundliche Aufnahme im Labor „ExperiMed“ für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin an der Chirurgischen Klinik der LMU-Innenstadt.

Herrn Privatdozent Dr. Elias Volkmer gilt mein Dank für sein unermüdliches Engagement, für die freundschaftlichen, stets aufmunternden Worte, seine beständige Unterstützung, und die immer gute Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit.

Für wertvolle Hilfe im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit möchte ich ebenso Herrn Professor Dr. Helmut Bartels Dank sagen. Insbesondere für seine freundliche Überlassung histologischer Schnittbilder, sowie darüber hinaus für seine beständige Begleitung und umfangreiche Förderung während meines gesamten Studiums der Humanmedizin, die mir auch über das reine Studium hinaus sehr hilfreich war.

Insgesamt wäre diese Arbeit ohne die Unterstützung meiner Kollegen in der Experimentellen Chirurgie nicht möglich gewesen. Besonders hervorheben möchte ich Herrn Tzvetan Popov, Paolo Alberton und Bobby Cherian Kallukalam die mich während der Entstehung der Arbeit unterstützt haben.

Nicht zuletzt geht mein besonders herzlicher Dank an meine Familie und meine Freunde, die mir mit großer Geduld und Selbstverständlichkeit stets einen Ausgleich und eine Ergänzung zu Labor, Studium und Klinik gegeben haben. Ihr Verständnis und Ihre Unterstützung waren und sind für mich unverzichtbar.

## Publikationen:

## Originalarbeiten:

- 1.) **Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation.**

Volkmer E, Kallukalam BC, **Maertz J**, Otto S, Drosse I, Polzer H, Böcker W, Stengele M, Docheva D, Mutschler W, Schieker M.

Experimental Surgery and Regenerative Medicine, Department of Surgery, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

*Tissue Eng Part A. 2010 Jan;16(1):153-64.*

- 2.) **High-grade KIT-negative sarcoma of the small bowel in a patient with chronic myeloid leukemia receiving long-term tyrosine kinase inhibitors.**

**Martz J**, Jain S, Vahdat LT, Qin L, Mosquera JM, Antonescu CR, Popa EC

*J Clin Oncol. 2013 Apr 10;31(11):e181-5.*

- 3.) **Congenital Cranial Dysinnervation Disorders (CCDD).**

Nentwich MM, Nentwich MF, **Maertz J**, Brandlhuber U, Rudolph G.

*Klin Monbl Augenheilkd. 2015 Mar;232(3):275-80.*

- 4.) **Genotype-Phenotype Correlation in Patients with PRPH2-Mutations.**

**Maertz J**, Gloeckle N, Nentwich MM, Rudolph G.

*Klin Monbl Augenheilkd. 2015 Mar;232(3):266-74.*

- 5.) **Wide-Field Megahertz OCT Imaging of Patients with Diabetic Retinopathy.**

Reznicek L, Kolb JP, Klein T, Mohler KJ, Wieser W, Huber R, Kernt M, **Märtz J**, Neubauer AS.

*J Diabetes Res. 2015; 2015:305084. doi: 10.1155/2015/305084. Epub 2015 Jul 27.*

- 6.) **Hypoxia and HIF-1 $\alpha$ -regulation do not affect proliferation of human mesenchymal stem cells but inhibit osteogenic differentiation in vitro.**

**Josef Maertz**, Maximilian Michael Saller, Kallukalam Bobby Cherian, Denitsa Docheva, Matthias Schieker, Elias Volkmer

*JSM Regenerative Medicine & Bioengineering*

- 7.) in progress

**Intrapapillary Proliferation in Optic Disc Pits: Aspect and Development**

**Maertz J**, Mohler KJ, Kolb JP, Klein T, Neubauer AS, Kampik A, Wieser W, Huber R, Wolf A

## Abstracts / Poster:

- 1.) **Josef Maertz**<sup>1</sup>, Bobby Cherian Kallukalam<sup>1</sup>, Wolf Mutschler<sup>1</sup>, Matthias Schieker<sup>1</sup>, Elias Volkmer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Experimental Surgery and Regenerative Medicine, Department of Surgery, LMU Munich

Effect of hypoxia and HIF-1-alpha regulation on proliferation and osteogenic differentiation of hMSC

*Langenbecks Arch Surg. 2009 Sep;394(5):915-70.*

*Abstracts of the 13th Annual Meeting on Surgical Research, 10-12 September 2009, Munich, Germany.*

- 2.) **J. Märtz**, E. Volkmer, B. Cherian, W. Mutschler, M. Schieker  
Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin  
Chirurgische Klinik und Poliklinik Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München · Innenstadt

Auswirkung der HIF-1 $\alpha$  Regulation auf Proliferations- und Differentiationsverhalten von hMSCs

*DAdorW-Frühjahrsakademie April 2009*

- 3.) **Maertz J**, Mohler KJ, Kolb JP, Klein T, Neubauer AS, Wieser W, Huber R, Wolf A

Aspect and development of intrapapillary proliferations in optic disc pits

*15. EURETINA Congress*

- 4.) **Maertz J**, Gloeckle N, Nentwich M, Rudolph

Correlation of Genotype and Phenotype in Patients with PRPH2-Mutations

*15. EURETINA Congress*

- 5.) **Josef März**, Nicola Glöckle, Martin Nentwich, Günther Rudolph

Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit PRPH2-Mutationen

*113. DOG-Kongress / Kasuistiken und Genetik*

- 6.) **Josef März**, Karsten Kortüm, Michael Müller, Simon Leicht, Kristina Prause, Felice Lob, Anselm Kampik, Thomas Kreuzer

Oberflächliche Verletzungen der Kornea und konsekutive Keratitis - eine Datenbankanalyse

*113. DOG-Kongress / Trauma*



## Eidesstattliche Versicherung

**Märtz, Josef Michael**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Auswirkung von Hypoxie und HIF-1 $\alpha$ Regulation auf Proliferations- und Differenzierungsverhalten von hMSCs**

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 einzeln 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.

Garching, 27.09.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand