

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

MUM – Muskuloskelettales Universitätszentrum München

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Boris Holzapfel

***Untersuchung der Funktion von Hyaluronan und
Hyaluronansynthesen im Knochen eines Mausmodells für
„Osteogenesis Imperfecta“ und im Knochen von
osteoporotischen Patienten***

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

vorgelegt von

Anastasiya Kornyeva

aus Makiivka (Ukraine)

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Eric. Hesse
Prof. Dr. Christian Prall

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	4
ABSTRACT	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	8
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	11
1. EINLEITUNG	13
1.1 ÜBERBLICK ÜBER DIE KNOCHENBIOLOGIE	13
1.2 MESENCHYMALE STAMMZELLEN	15
1.2. HYALURONAN: DEFINITION, STRUKTUR, FUNKTION UND ROLLE IM KNOCHENAUFBAU.....	17
1.3. SYNTHESE DES HYALURONANS	18
1.5. ROLLE DES HYALURONANS BEI DER ENTSTEHUNG VON DEGENERATIVEN KNOCHENERKRANKUNGEN.....	20
2. ZIELSETZUNG.....	23
3. MATERIAL UND METHODEN.....	25
3.1 MATERIAL.....	25
3.1.1 Chemikalien.....	25
3.1.2 Puffer und Lösungen	27
3.1.4 Antikörper	29
3.1.5 Medien.....	30
3.1.6 Zellkulturmaterialien	31
3.1.7 Tiere:.....	32
3.1.7.1 Wildtypmäuse:	32
3.1.7.2 Transgene Mäuse Aga2/+:	32
3.1.8 Zelllinien:.....	32
3.1.9 Standards	33
3.1.10 Kits	33
3.1.11 Geräte	33
3.1.10 Software.....	35
3.2 METHODEN.....	36
3.2.1 Zellkulturmethoden.....	36
3.2.1.1 Isolierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSCs) aus Mausknochen.....	36
3.2.1.2 Kultivierung von mMSCs	36
3.2.1.3 Passagieren von mMSCs	36
3.2.1.4 Zelldifferenzierung	37
3.2.2.1 Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs)	39
3.2.2.2 Kultivierung von hMSCs	39
3.2.2.3 Passagieren von hMSCs	40
3.2.2.4. Bestimmung der Zelldichte	40
3.2.2.5 Konservierung und Auftauen von mMSCs und hMSCs.....	40
3.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	41
3.2.2.1 Proteinisolierung aus mMSCs und hMSCs	41
3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	41
3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
3.2.2.4 Western Blot	42
3.2.2.4 Bestimmung des Hyaluronangehalts im Knochen.....	43

Inhaltsverzeichnis

2.2.2.5 Hyaluronanextraktion aus humanen Knochen.....	43
2.2.2.6 Hyaluronan-ELISA	44
2.2.4 Immunodetektion von Proteinen in mMSCs und in hMSCs.....	45
2.2.4.1 Immunfluoreszenz-Färbung mit HAS-Antikörpern.....	45
2.2.5 FACS-Analyse.....	45
2.2.6. Molekularbiologische Methoden	46
2.2.6.1 Isolierung von RNA aus mMSCs und hMSCs	46
2.2.6.2 Konzentrationsbestimmung von RNA	47
2.2.6.3 cDNA-Herstellung	47
2.2.6.4 Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	48
2.2.6.5 Analyse des gebildeten HAs	50
2.2.6.6 Analyse der Adhäsion	50
2.2.6.6 Analyse der Ausbreitung der hMSCs	50
3.1.7 STATISTIK	51
3. ERGEBNISSE	52
3.1. ETABLIERUNG DER ISOLIERUNG DER MURINEN MESENCHYMALEN STAMMZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK.....	52
3.2 ANALYSE DES OBERFLÄCHENMARKERPROFILS DER MMSCS	53
3.3 HERSTELLUNG DER OSTEOGENEN, ADIPOGENEN UND CHONDROGENEN ZELLINIEN AUS MMSCS	56
3.4 UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION DER HYALURONANSYNTHASEN IN DEN MMSCS.....	59
3.5 PATIENTENDATEN	60
3.6 BESTIMMUNG DER HYALURONANMENGE IM KNOCHEN VON KLINISCH OSTEOPOROTISCHEN PATIENTINNEN SOWIE VON KLINISCH NICHT-OSTEOPOROTISCHEN PATIENTINNEN	62
3.7 NACHWEIS DER HYALURONANSYNTHASEAKTIVITÄT IN DEN HMSCS AUS DEN SPENDERKNOCHEN	64
3.8 UNTERSUCHUNG DES HYALURONAN-COATS DER OSTEOPOROTISCHEN SOWIE NICHT-OSTEOPOROTISCHEN HMSCS	66
3.9. UNTERSUCHUNG DER EXPRESSION VON DER HYALURONANSYNTHASE HAS2 UND DEM HYALURONANREZEPTOR CD44 DER OSTEOPOROTISCHEN SOWIE NICHT-OSTEOPOROTISCHEN HMSCS.....	68
3.10 DER EINFLUSS DES HYALURONANS AUF DIE ADHÄSIONSEIGENSCHAFTEN DER SCP1-ZELLEN	70
3.11. DER EINFLUSS DES HYALURONANS AUF DIE ZELLAUSBREITUNG DER SCP1-ZELLEN.....	72
4. DISKUSSION.....	75
4.1. HERSTELLUNG DER MMSC-ZELLINIE SOWIE UNTERSUCHUNG DER EIGENSCHAFTEN VON MMSCS	75
4.2.CHARAKTERISIERUNG VON HMSCS AUS OSTEOPOROTISCHEN UND OSTEOPENEN PATIENTINNEN	79
4.3 DER HYALURONANGEHALT IN DEN KNOCHEN	81
4.4. EXPRESSION UND AKTIVITÄT DER HYALURONANSYNTHASEN IN DEN HMSCS.....	84
4.5 HYALURONANEINFLUSS AUF ADHÄRENTE EIGENSCHAFTEN SOWIE DIE AUSBREITUNG VON IMMORTALISIERTEN HMSCS	86
LITERATUR.....	90
DANKSAGUNG.....	99
AFFIDAVIT	100

Zusammenfassung

Hintergrund: Hyaluronan (HA) ist ein essenzieller Bestandteil von verschiedenen Geweben sowie Flüssigkeiten des Körpers. Als membranständiges Glykoprotein kommt HA ubiquitär, extrazellulär, intrazellulär, perizellulär, im Körper vor. Drei Hyaluronansynthasen (HAS1, HAS2, HAS3) produzieren HA. Hyaluronidasen sind für den Hyaluronanabbau verantwortlich. HA soll die Funktion von Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten kontrollieren. Somit scheint HA das Remodeling von Knochen zu regulieren. Die endgültige Funktion der Hyaluronan-Synthasen und des Hyaluronans in der Knochenhomöostase sowie deren Rolle in der Pathogenese der degenerativen Knochenerkrankungen sind noch nicht ausführlich untersucht.

Methoden: Für das Ziel der Arbeit wurde eine Methode der Aufreinigung und Kultivierung der murinen mesenchymalen Stammzellen etabliert. Im Labor wurde auch eine Methode entwickelt, um Hyaluronan aus den humanen Hüftköpfen der osteoporotischen und nicht-osteoporotischen Patienten zu extrahieren. Der Hyaluronangehalt wurde mithilfe eines kommerziellen ELISA-Kits bestimmt. Die hMSCs wurden direkt aus dem Knochenmaterial der Hüftköpfe isoliert. Das von den hMSCs in den Zellkulturüberstand abgegebene HA wurde mittels ELISA quantifiziert. Mittels sowohl eines biotinylierten HA-Bindeproteins als auch eines mit einem Fluorophore-konjugierten Streptavidins wurde der perizelluläre HA-Mantel gefärbt und verglichen.

Ergebnisse: Es wurde eine Aufreinigung und Kultivierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSCs) erfolgreich etabliert. Die isolierten Zellen konnten sich zu Osteoblasten, Adipozyten sowie Chondrozyten differenzieren. Die mMSCs weisen ein spezifisches Expressionsprofil von Oberflächenmarkern auf, das

in einer FACS-Analyse nachgewiesen werden konnte. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass die mMSCs alle drei HAS-Isoenzyme exprimieren

Mittels der ELISA-Methode wurde nachgewiesen, dass der HA-Gehalt in den osteopenen bzw. nicht-osteoporotischen Knochen im Vergleich zu den osteoporotischen Knochen erhöht ist. Dagegen ist die HA-Konzentration in den Zellüberständen aus den Zellen nicht-osteoporotischer Patienten im Mittel geringer als in den Zellüberständen aus den Zellen osteoporotischer Patienten.

Der Vergleich der Fluoreszenzsignale zwischen den hMSCs aus den osteoporotischen und nicht osteoporotischen Zellen zeigte keinen Unterschied in der Intensität.

Schlussfolgerung: Die etablierte Methode zur Aufreinigung und Kultivierung der mMSCs für weiterführende Untersuchungen des Hyaluronans sowie Hyaluronansynthesen unter anderem im Mausmodell „Osteogenesis imperfecta“ kann erfolgreich unter Laborbedingungen eingesetzt werden. Der Nachweis der HAS- sowie Hyaluronanfunktion kann für zukünftige Therapieoptionen bei Osteoporose, Osteogenesis imperfecta sowie anderen degenerativen Erkrankungen eine grundlegende Rolle spielen.

Abstract

Background: Hyaluronan (HA) is an essential component of various tissues and fluids in the body. HA is a membrane-like glycoprotein that occurs ubiquitously extracellular, intracellular, pericellular in the body. Three hyaluronan synthases (HAS1, HAS2, HAS3) produce HA. Hyaluronidases are responsible for the degradation of HA. HA is intended to control the function of osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. Thus, HA seems to regulate bone remodeling. The final function of hyaluronan synthases and hyaluronan in bone turnover and their role in the pathogenesis of degenerative bone diseases has not yet been fully investigated.

Methods: A method of purification and cultivation of murine mesenchymal stem cells was established for the purpose of this work. The laboratory also developed a method to extract hyaluronan from human hip heads of osteoporotic and non-osteoporotic patients. HA amount was determined using a commercial ELISA kit. The hMSCs were also isolated directly from the bone material of the femur head. The HA released by the hMSCs into the cell culture supernatant was also quantified by ELISA. The pericellular HAcoat was stained using a biotinylated HA-binding protein and a fluorophore-conjugated streptavidin.

Results: Purification and cultivation of murine mesenchymal stem cells (mMSCs) was successfully established. The isolated cells were able to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. The mMSCs exhibit a specific expression profile of surface markers, which could be detected in a FACS analysis. Immunofluorescence analysis showed that the mMSCs express all three HAS isoenzymes. By ELISA method was demonstrated that the HA amount in osteopenic and non-osteoporotic is increased compared to non-osteoporotic bones. Conversely, HA concentration in cell superimpositions from cells of non-osteoporotic patients is on average less than HA concentration in cell superimpositions from cells of osteoporotic

patients.

Comparison of fluorescence signals between hMSCs from osteoporotic and non-osteoporotic cells showed no difference in intensity.

Conclusion: The established method for purification and cultivation of mMSCs for further studies of HA and HAS in the mouse model “Osteogenesis imperfecta” can be successfully used under laboratory operations. The detection of HAS and HA function may play a fundamental role in future treatment options for osteoporosis, osteogenesis Imperfecta and other degenerative diseases.

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1. Das multipotente Potenzial der MSCs (Singer and Caplan 2011)</i>	<i>16</i>
<i>Abb. 4 Analyse der Morphologie der murinen mesenchymalen Stammzellen</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 5. FACS-Analyse des Expressionsprofils von Oberflächenmarkern der isolierten mMSCs: mMSCs sind für anti-Sca1, CD44 und CD105 positiv (A,B,C) und für die hämatopoetischen Marker CD11b, CD45 CD86 und anti- MHC II negativ (D,E,F) ...</i>	<i>55</i>
<i>Abb. 6. Alizarin-Red-Färbung der osteogen differenzierten mMSCs (A) sowie der unstimulierten Kontrolle (B).....</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 7. Oil-Red-O-Färbung von adipogen differenzierten mMSCs (A) sowie der unstimulierten Kontrolle (B).....</i>	<i>57</i>
<i>Abb. 8. Alcianfärbung der zu Chondrozyten differenzierten mMSCs (A), nicht stimulierte Zellen (B)</i>	<i>58</i>
<i>Abb. 9. Immunfluoreszenzanalyse der Expression der HAS-Enzyme (A: HAS1, B: HAS2, C: HAS:3, D: Zellen, die nur mit Sekundärantikörpern behandeln wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.</i>	<i>59</i>
<i>Abb. 10. Hyaluronangehalt in Knochen der nicht-osteoporotischen sowie osteoporotischen Patienten ($p = 0,09$)</i>	<i>63</i>
<i>Abb. 11. Die Gesamtaktivität der Hyaluronansynthasen in den Zellen der osteoporotischen (9SuS, 8SuS), sowie nicht-osteoporotischen (10SuS, 11SuS, 12SuS) Patienten.....</i>	<i>65</i>
<i>Abb. 12. Färbung des an die Zellen gebundenen Hyaluronans in den hMSCs von nicht-osteoporotischen (A) sowie osteoporotischen Patientinnen (B), Negativkontrolle (C). HA wurde mithilfe eines biotylierten HA-Bindeproteins (rot dargestellt) gefärbt. Aktin wurde mit einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Phalloidin gefärbt (grün dargestellt). Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau dargestellt).....</i>	<i>67</i>

Abb. 14 Die Untersuchung der initialen Anheftung der SCP1-Zellen auf HA-beschichteten Oberflächen mittels Time-Lapse-Mikroskopie. Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen in Gegenwart von N-Acetylglucosamin für 24 Stunden kultiviert. Nach Ablösung der Zellen wurden sie sofort ausgesät. Die Zellanheftung wurde durch die Abbildung der ersten Zellausstülpungen erkannt. (A–D) Mittels sigmoidaler Vier-Parameter-Logistik nicht lineare Regression der Adhäsionseigenschaften der Zellen auf mit Hyaluronan unterschiedlichen Molekulargewichts (HM: > 950 kDa, kDa, UNM: 4–8 kDa und NM: ca. 50 kDa) beschichteter bzw. unbeschichteter Oberfläche. Die Punkte entsprechen mindestens einer einzigen Zelle, die zum jeweiligen Zeitpunkt adhärert. Es sind die Werte von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. (E) Überlagerungen der nicht linearen Regressionskurven der Zellen für die vier untersuchten Bedingungen. (F) Mittelwerte für 50 % adhärenente Zellen. Die Werte wurden mittels sigmoidaler Vier-Parameter-Logistik für jedes der drei unabhängigen Experimente berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. 71

Abb. 15. Zellausbreitung von SCP1-Zellen auf Kunststoffoberflächen. Zellen mit (A) und ohne Hyaluronidase-(HAse)-Behandlung (B) wurden auf die Oberfläche von Zellkulturschalen unter serumfreien Bedingungen ausgesät und für 10, 20 und 40 min kultiviert. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder der mit BODIPY 581/591 SE gefärbten Zellen. (A–B) Dargestellt sind die mittlere Zelloberflächen 10, 20 und 40 min nach der Aussaat der unbehandelten Zellen (A) im Vergleich zu den mit HAse behandelten (B) Kontrollzellen. 73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Chemikalien 27

Tabelle 2. Primärantikörper..... 29

Tabelle 3. Sekundärantikörper..... 29

Tabelle 4. FACS-Antikörper 30

Tabelle 5. Kits 33

Tabelle 6. Geräte 35

Tabelle 7. Gelzusammensetzung für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 42

Tabelle 8. Beschreibung der verwendeten FACS-Antikörper (MACS Milteny Biontec)
 46

Tabelle 10. Reaktionsansatz für cDNA Herstellung 48

Tabelle 11. PCR Ansatz..... 49

Tabelle 12. PCR-Primer..... 50

Tabelle 13. Patientendaten 61

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bHABC	biotinyliertes Hyaluronanbindeprotein
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CD44	Cluster of Differentiation 44, Oberflächenrezeptor
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
kDa	Kilodalton, Einheit der molekularen Masse
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff für DNA
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
eGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescent activated cell sorting)
FBS	Fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum)
HA	Hyaluronan
HAS	Hyaluronansynthase
hMSC(s)	humane mesenchymale Stammzelle(n)
mMSC(s)	murine mesenchymale Stammzelle(n)
N ₂	Stickstoff
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)

RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
SCP1-Zellen	Immortalisierte hMSCs (engl.: single cell picked clone 1)
SDS	Natriumdodecylsulfat
α - MEM	alpha minimum essential medium

1.Einleitung

1.1 Überblick über die Knochenbiologie

Das Knochengewebe ist ein mineralisiertes Binde- und Stützgewebe. Die kortikalen Knochen von Erwachsenen bestehen zu 60 % aus Mineralstoffen, zu 20 % aus organischem Gewebe und zu 20 % aus Wasser (Katsimbri 2017).

Im Knochen sind vier Knochenzelltypen enthalten: Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und Osteovorläuferzellen (Raggatt and Partridge 2010). Die Osteoblasten entwickeln sich aus den Osteovorläuferzellen und sind für den Knochenaufbau zuständig, wobei sie unter anderem Kollagen Typ I, den Hauptbestandteil der Knochenmatrix, sekretieren. Als wichtige Knochenbestandteile nehmen die Osteoklasten am Knochenstoffwechsel teil. Diese Zellen entwickeln sich aus den hämatopoetischen Stammzellen. In Ruhe befinden sich die Osteoklasten im nicht polarisierten Zustand. Um den Knochenabbau (Resorption) zu aktivieren, müssen Osteoklasten an dem Knochen binden und in den polarisierten Zustand übergehen. Die Osteozyten sind die zahlreichsten Zellen des Knochengewebes und entstehen aus Osteoblasten. Sie sind reife Knochenzellen, die den Protein- und Mineralgehalt der Knochenmatrix aufrechterhalten (Katsimbri 2017).

Der Knochen wird ständig umgebaut, auch nachdem Wachstum und Modellierung abgeschlossen sind. Dabei wird der Knochenumbauprozess in die Aktivierungs-, Resorption-, Umkehr- und Formationsphase unterteilt (Florencio-Silva, Sasso et al. 2015). Jedes Jahr werden ca.10 % der menschlichen Gesamtknochenmasse erneuert (Lerner 2006).

Die Besonderheiten und Pathologien im Knochenumbauprozess sind enorm wichtig, um die Mechanismen der verschiedenen Knochenerkrankungen zu verstehen. Die Störungen des Gleichgewichts zwischen Knochenaufbau- und -abbau bilden die

Grundlagen für die Entstehung der Osteoporose und Osteogenesis imperfecta (Oohira and Nogami 1989).

Die Auf-, Um- und Abbauprozesse des Knochens werden durch verschiedene genetische und Umweltfaktoren beeinflusst (Borah, Dufresne et al. 2010). Dazu gehören lokale (z. B. Wachstumsfaktoren und Zytokine) und systemische (Hormone) Komponenten (Florencio-Silva, Sasso et al. 2015).

Die wichtigsten hormonellen Regulatoren der Knochenmineralhomöostase sind Parathyroidhormon, Parathyroidhormon-ähnliches Peptid sowie Vitamin D. Das Parathyroidhormon steigert die Kalzium- sowie Phosphatfreisetzung im Knochen. Parallel zu diesen Prozessen wird die Kalziumrückresorption in der Niere verbessert sowie die Phosphataufnahme gehemmt (Nijenhuis, Hoenderop et al. 2005; Grabowski 2009).

Während der Embryonalentwicklung und des Wachstums werden die Größe, Form und Architektur der Knochen durch das Entfernen des Materials aus den äußeren und inneren Schichten angepasst. Das Knochengewebe ist sehr dynamisch. Es passt sich ständig an die neuen Bedingungen an. Für das Wachstum sowie die mechanisch induzierte Anpassung ist der Knochenumbauprozess essenziell. Knochenaufbau und -abbau verlaufen synchron, um die gleiche Knochenmasse zu erhalten (Raggatt and Partridge 2010).

Im Laufe des Lebens kann aufgrund sowohl des Lebensstils als auch von Komorbiditäten die Knochenhomöostase gestört werden. Das bedeutet, dass mehr Knochen abgebaut als aufgebaut werden, was die Entwicklung von Osteoporose oder in seltenen Fällen bei erhöhtem Knochenaufbau Osteopetrose zur Folge haben kann. Dies führt zur Störung der Knochenarchitektur und der -dichte und somit zur gesteigerten Knochenbrüchigkeit. Beim Verlust der Knochenmasse gewinnt der

intrakortikale Knochenaufbau zunehmend an Bedeutung (Raggatt and Partridge 2010).

Die Untersuchungen der Regulation des Knochenbaus eröffnen neue Möglichkeiten bei der Diagnose und der Behandlung von Knochenerkrankungen. Neue Methoden in der Molekular- und der Zellbiologie helfen, Funktionsstörungen der verschiedenen Knochenzellarten, die zu Skeletterkrankungen führen, zu differenzieren und neue Ansätze der Therapie, die auf dem Verständnis der Pathologie der Prozesse basieren, zu entwickeln (Hadjidakis and Androulakis 2006).

1.2 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen können aus fast allen Organen und Geweben isoliert werden. Zellen können als mesenchymale Zellen bezeichnet werden, wenn sie ein multipotentes Potenzial besitzen und sich in die drei Zellabstammungen (Ektoderm, Entoderm und Mesoderm) differenzieren lassen (da Silva Meirelles, Chagastelles et al. 2006)

In der Literatur existieren verschiedene Theorien über die Definition sowie die Bezeichnung der multipotenten Knochenzellen. Seit 1991 werden Zellen, die aus dem Knochenmark aufgereinigt wurden, als mesenchymale Stammzellen bezeichnet (Owen and Friedenstein 1988). Caplan et al. schlagen die Bezeichnung „medizinische Signalzellen“ vor, da die Zellen verschiedene bioaktive Faktoren, wie z. B. Wachstumsfaktoren, antimikrobielle Peptide/Proteine und Zytokine, sekretieren, dadurch das Immunsystem supprimieren und Infektionen verhindern können (Caplan 2017).

Konventionell werden diese Zellen aus dem Knochenmark isoliert (Pittenger, Mosca et al. 2000). Die Fähigkeiten zur Regeneration haben diese Zellen vom mesenchymalen Gewebe wie Knochen, Knorpel, Muskeln, Bändern, Sehnen, Fett und Stroma übernommen (Friedenstein, Piatetzky et al. 1966).

Mehrere Untersuchungen konnten *in vitro* dieses multipotente Potenzial der mesenchymalen Stammzellen nachweisen.

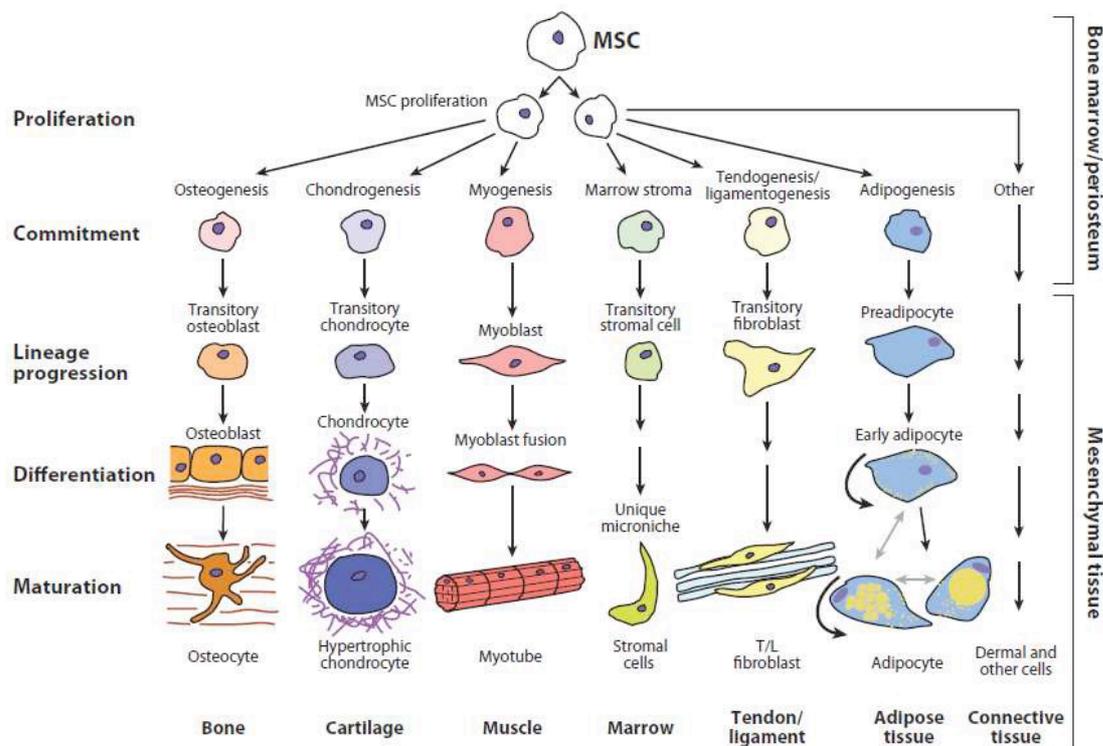


Abb. 1. Das multipotente Potenzial der MSCs (Singer and Caplan 2011)

Nicht nur stehen zahlreiche Studien, die die Eigenschaften der MSCs unterschiedlicher Spezies untersuchen, zur Verfügung, es wurden auch bereits verschiedene Methoden der Isolierung und Kultivierung sowie Charakterisierung beschrieben (Li, Ghazanfari et al. 2016).

Das Mesenchym- und Gewebestammzellenkomitee der Internationalen Gesellschaft für Zellulärtherapie hat einige Minimalkriterien zur Definition der humanen MSCs vorgeschlagen. Die Zellen sollen an die plastische Oberfläche anhaften können. Als weiteres Kriterium müssen die Zellen CD105, CD73 und CD90 exprimieren und dürfen keine CD45, CD34, CD14 und CD11b, CD19 und HLA-DR-Oberflächenmarker exprimieren (Lv, Tuan et al. 2014). Und natürlich müssen die Zellen *in vitro* als Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenziert werden können (Dominici, Le Blanc et al. 2006). Die murinen MSCs weisen andere Stammzellenmarker als

hMSCs auf: Anti-Sca-1, CD 29, CD 44, CD 11b, CD 34, CD 45, CD 86, Anti-MHC Class II (Baddoo, Hill et al. 2003).

1.2. Hyaluronan: Definition, Struktur, Funktion und Rolle im Knochenaufbau

Das Hyaluronan (HA) ist ein langes und einfach aufgebautes Polysaccharid, das aus wiederholenden Disacchariden aus D-Glycoronsäure und N-acetyl-D-Glucosamin besteht. Das Polysaccharid kommt ubiquitär extrazellulär und perizellulär in den Körperflüssigkeiten und im Gewebe vor.

Obwohl HA bereits im Jahr 1934 biochemisch gereinigt wurde und seine chemische Struktur im Jahr 1954 aufgeklärt wurde, sind seine Rolle und Funktionen bis jetzt nicht vollständig verstanden (Lee and Spicer 2000).

Das HA scheint den Knochenumbauprozess von Knochen zu regulieren, indem es die Funktion von Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten kontrolliert (Bastow, Byers et al. 2008).

In vivo kommt HA in unterschiedlichen Größen vor, es kann somit das Zellverhalten unterschiedlich beeinflussen. Die Größe von Hyaluronan wird bestimmt durch die enzymatische Aktivität der aufbauenden Hyaluronansynthasen und abbauenden Hyaluronidasen. In Säugern kommen drei Isoenzyme der Hyaluronansynthasen vor: HAS1, HAS2, HAS3. Diese synthetisieren HA in verschiedenen Größen (Calabro, Oken et al. 2002).

Das HAS1-Enzym wurde als erstes entdeckt. Es konnte aus cDNA-Bibliotheken entsprechend der Funktion identifiziert werden. Später wurden HAS2 sowie HAS3 entdeckt. Alle drei oben genannten Enzyme, HAS1, 2 und 3, werden sowohl in embryonalen als auch in adulten Geweben exprimiert. Während der Entwicklung scheint HAS2 die wichtigere Rolle zu spielen, dagegen wird HAS3 in adulten Geweben am meisten exprimiert (Fraser, Laurent et al. 1997).

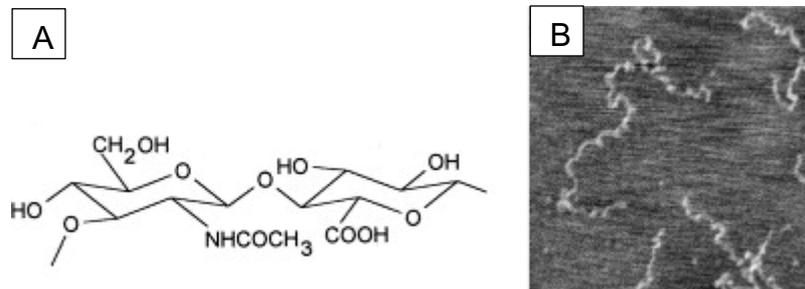


Abb.2. Chemische Struktur des Hyaluronans (A); Bild von Hyaluronanketten, die mittels Atomkraftmikroskopie aufgenommen wurden (B) (Cowman and Matsuoka 2005)

Die Hyaluronanbindeproteine sind für die Bildung der perizellulären Matrix zuständig. Durch die Bindung von HA an diesen Rezeptoren werden Signalwege ausgelöst und das Zellverhalten reguliert.

Das HA wird in der Zellmembran synthetisiert und über einen noch unbekanntem Mechanismus in die extrazelluläre Matrix gebracht. Der durchschnittliche menschliche Körper von 70 kg enthält ca. 15 g Hyaluronan, davon befinden sich 25 % in Knochen und Gelenken (Calabro, Oken et al. 2002).

1.3. Synthese des Hyaluronans

Die Gesamtmenge des HAs, die produziert werden soll, wird durch die Menge und die Aktivität von Hyaluronsynthasen (HAS), die für die Produktion der Hyaluronsäure verantwortlich sind, bestimmt (Calabro, Oken et al. 2002). Dabei korreliert die Aktivität von HAS nicht immer mit der Menge des produzierten HAs (Itano and Kimata 2002).

Die Rolle der HAS-Isoenzyme ist noch nicht ausreichend verstanden. *In vitro* besitzen HAS-Isoenzyme unterschiedliche biochemische Eigenschaften in Bezug auf die Größe

des synthetisierten HAs und die eigene katalytische Aktivität. Bei vielen pathophysiologischen Bedingungen ist die HA-Kettenlänge von entscheidender Bedeutung (Ferguson, Roberts et al. 2011).

Die Expression jeder HAS-Isoform wird unterschiedlich kontrolliert. In biologischen und physiologischen Prozessen besitzen die HAS-Enzyme verschiedene Funktionen. Das HA wird in der inneren Plasmamembran synthetisiert, an dem Ort der Zelle, wo sich auch die HAS-Enzyme befinden. Danach wird HA mittels HAS-Proteinkomplexe in die extrazelluläre Matrix transportiert. Dieser Prozess ist in der **Abb. 2** dargestellt.

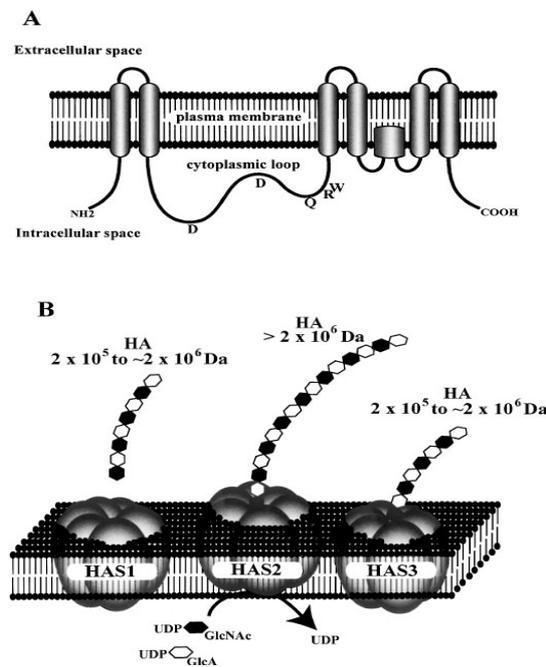


Abb.3. Eine mögliche Struktur der HAS-Isoformen und das hypothetische Modell für die HA-Synthese (Itano and Kimata 2002)

Jedes HAS-Enzym scheint unabhängig von den anderen aktiv zu sein. Die Regulation von HA-Biosynthese stellt sich in Säugern als ein multifaktorieller Prozess dar, der aus transkriptionellen und posttranskriptionellen Vorgängen besteht (Itano and Kimata 2002).

Die Hyaluronidasen und die Wirkung von Sauerstoffradikalen können Hyaluronan in kurze Oligosaccharide fragmentieren und somit zum Hyaluronanabbau führen. Diese Prozesse wiederum können die entzündlichen Vorgänge und die Aktivierung im Körper auslösen.

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass HAS1 in Zellen mit geringer Versorgung mit UDP-Substrat fast inaktiv sein kann. Dagegen nimmt die HAS2-Aktivität mit der Zugabe des UDP-Zuckers zu, und HAS3 arbeitet sogar bei einem minimalen Substratgehalt mit einer hohen Geschwindigkeit (Rilla, Tiihonen et al. 2008).

1.5. Rolle des Hyaluronans bei der Entstehung von degenerativen Knochenerkrankungen

Das HA kann die Expression von verschiedenen Genen stimulieren sowie die Entzündungsreaktionen und Gewebereparaturmechanismen regulieren. Zum Schutz vor umweltbedingten Gewebeschäden trägt das HA bei, das sich an den Zelloberflächen befindet, und es fördert die Regulation und Wiederherstellung des Gewebes. Die Interaktionen von Hyaluronan mit seinen Bindungsproteinen spielen eine große Rolle bei der Pathogenese vieler Krankheiten (Liang, Jiang et al. 2016).

In der Literatur wurde auch beschrieben, dass die gesamte Menge von Hyaluronan im Knochen von Patienten mit Osteogenesis imperfecta, einer Erbkrankheit, die mit Mutationen im Kollagen vom Typ I assoziiert ist und zu einer erhöhten Fragilität der Knochen führen kann, im Vergleich zu gesunden Knochen 1,5- bis 3-fach erhöht ist (Oohira and Nogami 1989).

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine reduzierte Knochenmasse sowie einen deutlichen Qualitätsverlust des Knochengewebes, verbunden mit einer Steigerung der Knochenbrüchigkeit und einem erheblichen Risiko für die Entstehung einer Knochenfraktur, gekennzeichnet ist (Wahner 1989).

Es sind mehreren Risikofaktoren bekannt, die zur Entstehung der Osteoporose führen können. Dazu zählen das Alter, das Geschlecht, niedriger Body-Mass-Index, eine Therapie mit Glukokortikoiden, das Rauchen, der Alkoholkonsum sowie die Ursachen der sekundären Osteoporose (Kanis, McCloskey et al. 2013).

Die Diagnostik der Osteoporose basiert auf der Bestimmung des T-Scores für die Knochendichte, die durch DXA an dem Oberschenkelhals und der Wirbelsäule gemessen werden kann. In diesem Fall wird die Osteoporose als DXA-Wert für Knochenmineraldichte mit Standardabweichung von 2,5 oder mehr unterhalb des Mittelwertes der jungen weiblichen Erwachsenen definiert (Kanis, McCloskey et al. 2013).

Die DXA-Methode ermöglicht, Osteoporose frühzeitig zu erkennen, also das gesamte Skelett zu beurteilen, um die Knochenfestigkeit sowie ein Frakturrisiko einzuschätzen. DXA bezeichnet eine hochspezifische und präzise Methode der nichtinvasiven Messmethoden der Knochendichte (Genant, Faulkner et al. 1993).

Heutzutage wird DXA als Standardmethode zur Beurteilung der Knochenmasse verwendet. Dabei spielen die Identifizierung von Risikopatienten, die Notwendigkeit, eine Therapie festzustellen, sowie die Überwachung der Ergebnisse eine enorm wichtige Rolle (Truscott, Devlin et al. 1996; Hammond and Lyons 2020).

Bei Erwachsenen ab 50 Jahren wird die Klassifikation der WHO angewendet. Abhängig von den DXA-Werten können die Patienten drei Kategorien zugeordnet werden. Diese werden anhand des niedrigsten T-Scores für die Lendenwirbelsäule, den Oberschenkelknochenhals oder die gesamte Hüfte ermittelt. Für jüngere Erwachsenen existieren nur zwei mögliche diagnostische Kategorien, und diese werden anhand des niedrigsten Z-Scores der gleichen Knochen bestimmt. Für das Alter 50 Jahre und darüber hinaus wird ein T-Score $\geq -1,0$ als normal angesehen; T-Scores zwischen $-1,0$ und $-2,5$ deuten auf eine geringe Knochenmasse hin, und T-

Score ≤ 2.5 wird als manifeste Osteoporose bewertet (Siris, Adler et al. 2014; Hammond and Lyons 2020).

Aufgrund des steigenden Alters und der damit verbundenen Reduzierung der Knochenmineraldichte erhöht sich der Verlust der Knochenmasse. Dadurch steigt die Prävalenz der Osteoporose, die somit auch mit der demografischen Entwicklung der Bevölkerung zusammen hängt (Kanis, McCloskey et al. 2013).

Der Knochenabbauprozess kann oft asymptomatisch verlaufen und sich erst durch eine Knochenfraktur bemerkbar machen. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, die niedrige Knochenmasse und die daraus resultierende Osteoporose so früh wie möglich zu diagnostizieren, um dem Patienten eine passende frakturpräventive Therapie anzubieten sowie mögliche Risiken, die zu einem weiteren Knochenverlust führen können, zu erkennen und zu minimieren (Chun 2011).

Aktuell sind mehrere Osteoporose-Therapiemöglichkeiten (Gosch, Stumpf et al. 2018; Stumpf, Hesse et al. 2019) bekannt. Die Hauptziele der Therapie sind auf die Erhöhung der Knochenmineraldichte gerichtet, und die aktuelle Therapie der Osteoporose basiert zumeist auf Medikamenten, wie z. B. Bisphosphonaten, die die Hemmung der Knochenresorption bewirken. Neuere therapeutische Entwicklungen basieren dagegen auf der Förderung der Knochenregulation. In der Osteoporose-Therapie wird den mesenchymalen Stammzellen ein großes therapeutisches Potenzial zugewiesen. Sie können zu einer Zellquelle für die zellbasierte Therapie von Knochenerkrankungen werden (Siris, Adler et al. 2014).

2. Zielsetzung

Die oben beschriebenen Funktionen der Hyaluronan-Synthasen sowie ihres Produkts Hyaluronan können eine wichtige Rolle nicht nur in der Knochenhomöostase, sondern auch in der Pathogenese der degenerativen Knochenerkrankungen wie Osteoporose und Osteogenesis imperfecta einnehmen. Bis jetzt ist der genaue Mechanismus des Hyaluronans in Bezug auf das Verhalten von mesenchymalen Stammzellen, wie z. B. Differenzierung, Adhäsion, Zellausweitung und Migration, wenig untersucht. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob zum einen sich der Hyaluronangehalt in Knochen von osteoporotischen und nicht-osteoporotischen Patienten unterscheidet und zum anderen dieser Unterschied auf einer veränderten Aktivität der Hyaluronansynthese in den humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) beruht. Außerdem soll untersucht werden, ob Hyaluronan die Adhäsion von hMSCs beeinflusst. Dafür wurde eine Methode entwickelt, um Hyaluronan aus humanen Hüftköpfen von osteoporotischen sowie nicht-osteoporotischen Patienten zu extrahieren und mithilfe eines kommerziellen ELISA-Kits zu bestimmen. Außerdem wurden hMSCs aus dem Knochenmaterial isoliert, um das von den hMSCs in den Zellkulturüberstand abgegebene HA mittels ELISA zu quantifizieren. Der perizelluläre HA-Mantel wurde unter Verwendung eines biotinylierten HA-Bindeproteins und eines mit Fluorophor konjugierten Streptavidins gefärbt.

In diese Arbeit soll der Grundstein gelegt werden, um die Rolle von Hyaluronan im Mausmodell sowohl für Osteogenesis imperfecta als auch für Osteoporose untersuchen zu können. Zu diesem Zweck soll im Labor die Isolierung und Kultivierung der murinen mesenchymalen Stammzellen etabliert werden.

Auf der Basis eines besseren Verständnisses der Rolle sowie der Funktion des Hyaluronans und der Mechanismen, die das Hyaluronan in den Knochenzellen beeinflussen, können in der Zukunft neue Therapieansätze ermöglicht und neue

Strategien in der Prävention und Heilung von Osteoporose sowie Osteogenesis imperfecta etabliert werden.

3.Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

10 x PCR-Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
5 x Reporter Lysis Buffer	Promega, Madison, USA
StemPro Accutase	Gibco, USA
Acrylamid	BioRad, Hercules, USA
Agarose	Biozym, Wien, Österreich
Alizarin Red	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München
BSA	Roth, Karlsruhe
Kollagen I	Temecula, California, USA
Kollagenase Type 1	Worthington, Lakewood
Kollagenase Type 2	Worthington, Lakewood
D-PBS	Biochrom, Berlin
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem GmbH, Darmstadt
dNTP Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
FBS MSC	Gibco, Mexico
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe

HEPES	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
IBMX	Sigma-Aldrich, München
Indomethacin	Sigma-Aldrich, München
Insulin	Sigma-Aldrich, München
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München
L-Cystein	Sigma-Aldrich, München
L-Proline	Sigma-Aldrich, München
Luminata	Millipore Corporation, Billerica, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Na-Acetat	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
Oil Red O	Sigma-Aldrich, München
Papain	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin
Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim
SDS	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, München
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, München
Taq-Polymerase	Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Sigma-Aldrich, München Sigma-Aldrich, München

Triton X-100	Fluka, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Zellkulturmedium D-MEM/F12	Biochrom, Berlin
Gibco ® Zellkulturmedium D-MEM high Glucose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gibco ® Zellkulturmedium D-MEM low Glucose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 1. Chemikalien**3.1.2 Puffer und Lösungen**10 × Laufpuffer:

0,25 M Tris-Base

1,92 M Glycin

1 % SDS

10 × Blottingpuffer:

0,25 M Tris-Base

1,92 M Glycin

auf pH 8,3 einstellen

10 × Blottingpuffer:

0,25 M Tris-Base

1,92 M Glycin

auf pH 8,3 einstellen

1 × Blottingpuffer

10 % 10 x Blottingpuffer

20 % Methanol

70 % dH₂O

Waschpuffer-TBST:

10 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

0,05 % Tween 20

Blockierlösung:

5 % Magermilchpulver

in TBST-Puffer

Stripping-Puffer:

100 mM β -Mercaptoethanol

2 % SDS

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8

4 x Laemmli-Puffer:

200 mM Tris-HCl pH 6,8

40 % Glycerol

10 % SDS

30 % β -Mercaptoethanol

0,02 % Bromphenolblau

50 x TAE-Puffer:

242 g Tris-Base

57,1 ml reine Essigsäure

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

ad 1 l mit H₂O, auf pH 8,3 einstellen

3.1.4 Antikörper*Primärantikörper*

Antikörper	Wirt	Firma
Anti-HAS1	Kaninchen	Bioss
Anti-HAS2	Kaninchen	Sigma, Bromma, Schweden
Anti-HAS3	Kaninchen	Sigma
Anti-Actin	Maus	Santa Cruz Biotech, Heidelberg

Tabelle 2. Primärantikörper*Sekundärantikörper*

Antikörper	Wirt	Firma
HRP-konjugiert anti-	Kaninchen	Cell SignalingTechnology
Alexa-Fluor 488-konjugiert,	Ziege	Life Technogies, Darmstadt

Tabelle 3. Sekundärantikörper*FACS-Antikörper:*

Alle benutzten FACS-Antikörper wurden von der Firma Miltenyi Biotec GmbH in Bergisch Gladbach, Deutschland hergestellt.

Antikörper	konjugierter Fluorophor
Anti-Sca-1	PE
CD29	APC
CD44	FITC
CD11b	FITC
CD34	FITC
CD45	FITC
CD45	FITC

CD86	FITC
Anti-MHC Class II	FITC
Rat IgG2a	PE
REA Control	FITC
Rat IgG2b	FITC

Tabelle 4. FACS-Antikörper

3.1.5 Medien

Medien für Zellkultur

Kulturmedium für mMSCs:

10 % FBS

1 % Penicillin/Streptomycin

3,7 mg/ml HEPES

in D-MEM/F12

Kulturmedium für hMSCs:

10 % FBS

1 % Penicillin/Streptomycin

in α MEM

Differenzierungsmedium:

Osteogenes Differenzierungsmedium:

10 % FBS

1 % Penicillin/Streptomycin

100 nM Dexamethason

10 mM β -Glycerophosphat

50 μ M L-Ascorbinsäure

in D-MEM/F12

Chondrogenes Differenzierungsmedium:

Induktionsmedium:

10 % FBS

1 % Penicillin/Streptomycin

1 μ M Dexamethason

0,2 mM Indomethacin

0,1 mg/ml Insulin

1 mM IBMX

in D-MEM/F12

Konservierungsmedium:

10 % FBS

1 % Penicillin/Streptomycin

0,1 mg/ml Insulin

in D-MEM/F12

Chondrogenes Differenzierungsmedium (Micromass):

Einfriermedium für mMSCs:

10 % DMSO

20 % FBS

70 % mMSCs Kulturmedium

Einfriermedium für hMSCs:

10 % DMSO

20 % FBS

70 % hMSCs Kulturmedium

3.1.6 Zellkulturmaterialien

Zellkulturflaschen 25, 75, 150, 225 cm²

Nunc, Wiesbaden

Zellkulturplatten 6-, 24-, 48-Well)

Nunc, Wiesbaden

3.1.7 Tiere:

3.1.7.1 Wildtypmäuse:

Für die Etablierung der Aufreinigung der mMSCs wurde BALB/C-Mäuse im Alter von acht Wochen sowie neugeborene Tiere verwendet.

3.1.7.2 Transgene Mäuse *Aga2/+*:

Die Verwendung der transgenen Tiere wurde für die Experimente im Rahmen der Osteogenesis-imperfecta-Studie geplant. Mäuse vom Typ *Aga 2/+* zeigen im Alter von fünf Wochen ein abnormales Gangbild aufgrund einer Deformierung der Hintergliedmaßen (Puk, Yan et al. 2013).

Die Mauslinie stellt einen Modellorganismus für die menschliche Osteogenesis imperfecta dar, die die terminale C-Propeptid-Region von Coll a1 beeinflusst (Thomas S. Lisse et al 2008).

3.1.8 Zelllinien:

mMSCs:

Die Zellen wurden mit einer in der vorliegenden Arbeit etablierten Methode aus den Femura neugeborener Mäusen isoliert.

hMSCs:

Die Zellen wurden im Laufe des Projektes aus der Spongiosa der humanen Hüftköpfe und aus Hüftendoprothesen nach Standardprotokoll isoliert. Genehmigt von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (Nr.:19–177, 24. Juli 2019) wurden die Studien gemäß der Erklärung von Helsinki durchgeführt. Alle Spender haben die Genehmigung für die Verwendung des Gewebes unterzeichnet.

SCP1-HAS1-eGFP D6, SCP1-HAS2-eGFP und SCP1-HAS3-eGFP E6

Immortalisierte hMSCs (SCP1) (Haasters, Prall et al. 2013) wurden im Labor über lentiviralen Gentransfer jeweils mit einer der Isoformen der Hyaluronansynthasen mit

einem C-terminalen eGFP-tag (HAS1-eGFP, HAS2-eGFP oder HAS3-eGFP) transduziert. Die stabile Expression beider Gene wurde auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen (Reiprich, Akova et al. 2021).

SCP1-MOCK

Diese Zelllinie wurden zur Kontrolle mit Leervektor transduziert.

3.1.9 Standards

GeneRuler 1kb DNA-Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Protein Standard Bezeichnung, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.10 Kits

TECO Hyaluronic Acid plus ELISA KIT	TECOmedical GmbH, Bünde
Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit	Roche, Penzberg
RNeasy Mini Kit mit QiaShredder	Qiagen, Hilden
Stem TAG™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Colorimetric)	Cell Biolabs Inc. BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland
Precellys hard tissue lysing Kit, MK28 R	Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, France

Tabelle 5. Kits

3.1.11 Geräte

Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Biocap DNA-RNA/DNA	Captair bio by ErLab, Cedex, Frankreich

Durchflusszytometer FACS Calibur	BD, Heidelberg
Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophorese-Spannungsquelle	Peqlab, Erlangen
Elektrophorese-Gel-Entwickler	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Entwickler für Westernblot-Membran	GE Healthcare, München
Feinwaage	Kern, Balingen
Kleiner Brutschrank	Jouan GmbH, Unterhaching
Laborwärmeschrank für Zellkultur	Kendro Laboratory Products, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte	Bachhofer, Reutlinger
Microkryotom	Thermo Fisher Scientific, Walldorf
Mikropipetten	Glison, Middleton, USA
Mikroskop AxioObserver.Z1, AxioCam MRm	Zeiss, Oberkochen
Mikrowellengerät	AEG Hausgeräte GmbH, Nürnberg
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, California, USA
Mini-Protean 3 (Gelkammer)	Bio-Rad, California, USA
Minizentrifuge	Biozym, Wien
Mischer Vortex Typ Relax	Heidolph, Schwabach
Multi-Funktions-Zentrifuge	Jouan, Unterhaching
Multigas Inkubator (Hypoxia)	Sanyo
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Multiskan FC (ELISA) MCO-5M	Thermo Scientific, Vantaa, Finland
NanoDrop Lite, Spectrophotometer	Thermo Fisher scientific, Madison, USA
Neuerbauer Zählkammer	Brand, Wertheim

PCR Doppelblock-Thermo Cycler	Peqlab, Erlangen
Pipetboy	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquelle für Western Blot	Consort, Turnhout, Belgien
Thermomixer, Typ Comfort mit Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank	GFL, Burgwedel
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem	HLC BioTech, Bovenden
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zellkultur-Mikroskop, Typ Diavert	Leitz, Wetzlar
Zellkultur-Zentrifuge	Thermo Scientific, Schwerte

Tabelle 6. Geräte

3.1.10 Software

Adobe Illustrator Version 25.2.3

Adobe Photoshop Version 8.0

FlowJo FACS analysis Software Version

GraphPad PRISM Version 8

R Statistik Version 3.6.2

Fiji 9.9

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturmethoden

3.2.1.1 Isolierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSCs) aus Mausknöcheln

Die Etablierung der Isolierung von murinen mesenchymalen Stammzellen wurde mit Wildtypmäußen (3.1.6) durchgeführt. Dafür wurden Mäuse verschiedenen Alters und für das endgültige Protokoll nur neugeborene Mäuse verwendet. Die Tiere wurden per zervikaler Dislokation getötet. Die vorderen und hinteren Extremitäten wurden beidseits abgetrennt. Mithilfe eines Skalpell wurden die Knochen mechanisch und gründlich von dem Weichteilgewebe gereinigt. Die Epiphysen der Knochen wurden abgetrennt, die übriggebliebenen Knochenteile zerkleinert und in ein Falcongefäß überführt. In das Gefäß wurde 10 ml Kollagenase-II-Lösung gegeben und diese 45 min bei 37°C auf einem 3D-Schüttler inkubiert, um die Stammzellen aus den Knochen möglichst gut befreien zu können. Nachdem die übriggebliebenen großen Partikel mittels eines 100 µm-Siebs entfernt worden waren, wurde die Zellsuspension für 5 min bei 400 xg abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium (Kulturmedium für mMSCs) resuspendiert und in eine T75-Kulturflasche überführt.

3.2.1.2 Kultivierung von mMSCs

Die Kultivierung der gewonnenen Zellen erfolgte bei 2 % O₂ und bei 37°C. Mindestens zweimal pro Woche wurde das Medium gewechselt.

3.2.1.3 Passagieren von mMSCs

Das Kulturmedium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit D-PBS einmal gewaschen. Anschließend wurde zu den Zellen Accutase StemPro (1:10) gegeben. Die Zellkulturflaschen wurden ca. 10 min bei 2 % O₂ und bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellen sich vollständig abgelöst hatten, wurde die doppelte Menge des

Kulturmediums in die Flasche gegeben, um die Reaktion der Accutase StemPro zu stoppen. Durch mehrmaliges Spülen wurden die Zellen vom Flaschenboden vollständig abgelöst, und die Zellsuspension wurde für weitere Experimente oder weitere Zellkultivierung verwendet.

3.2.1.4 Zelldifferenzierung

Um die pluripotenten Zelleigenschaften der mMSCs nachzuweisen, wurden isolierte Zellen in drei Zellarten ausdifferenziert.

Osteogene Differenzierung

Um die osteogene Differenzierung der Zellen durchführen zu können, wurden die Zellen in 6-Well-Titerplatten ausgesät (ca. 80.000 Zellen/Well). Nachdem eine annähernd hundertprozentige Konfluenz der Zellen erreicht worden war, wurde sie mit dem osteogenen Differenzierungsmedium (3.1.5) über 21 Tage stimuliert.

Alizarin-Färbung

Die Färbung der Kalziumablagerungen zur Kontrolle von ausdifferenzierten Zellen erfolgte nach 21 Tagen Stimulierung. Hierzu wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung mit 4 % PFA in 1 × PBS über 30 min bei Raumtemperatur. Nachdem die Fixierlösung entfernt worden war, wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen, wurde die Alizarin-Lösung auf die Zellen gegeben und über 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Alizarin-Lösung abgesaugt, und die Zellen wurden so lange mit PBS gewaschen, bis in der Waschlösung keine rote Farbe mehr zu sehen war. Nach dem Trocknen erfolgte die Fotodokumentation unter Verwendung des Mikroskops AxioObserver.Z1, AxioCam Mm (Zeiss, Oberkochen).

Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Zelldifferenzierung wurden auch die Zellen verwendet, die vorher in 6-Well-Titerplatten ausgesät wurden und 90 % Konfluenz erreicht haben. Die Zellen

wurden über 14 Tage mit einem Induktionsmedium und anschließend für sieben Tage mit einem Erhaltungsmedium stimuliert. Anschließend wurden sie mit Oil Red O gefärbt.

Oil-Red-O-Färbung

Nach 21 Tagen adipogener Stimulierung wurde die Oil-Red-O-Färbung durchgeführt. Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und anschließend mit 50 % gekühltem Ethanol gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,2 % Oil-Red-O-Lösung bedeckt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang erfolgte wieder mit 50 % gekühltem Ethanol und im Anschluss mit H₂O. Die Fotodokumentation erfolgte am Mikroskop AxioObserver.Z1, AxioCam MRm im wässrigen Milieu.

Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierung der Zellen wurde mittels der sogenannten Micromass-Methode durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen nach Standardprotokoll abgelöst und gezählt. Die Zellsuspension wurde auf zwei 15 ml-Falcons verteilt und für 5 min bei 800 xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde jeweils in einem komplettem – (Wachstums-) bzw. im inkomplettem – (Kontroll-)Medium mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^2$ Zellen/ml resuspendiert. Die 10 µl der Zellsuspension wurden in die 96-Well-Platte in Triplikaten überführt und über drei Wochen bei 2 % O₂ inkubiert. Nachdem die Zellen vollständig adhärent gewesen waren, wurden diese mit Medium bedeckt und bei 2 % O₂ inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal in der Woche.

Alcianblau-Färbung

Das Zellmedium wurde vorsichtig abgenommen, und die Zellen wurden mit D-PBS gewaschen. Nach der Fixierung der Zellen mit 4 % PFA über 30 min wurde zweimal mit D-PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen mit 1 % Alcianblau-Lösung für zwei

Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen zuerst zweimal mit 70 % Ethanol und danach mit H₂O gewaschen. Die Fotodokumentation erfolgte mithilfe des Mikroskops AxioObserver.Z1 und der Farbkamera AxioCam MRm

2.2.2.1 Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs)

Die Methode, humane mesenchymale Stammzellen zu isolieren, wurde bereits im Labor etabliert und ähnelt der von mMSCs. Die Zellen wurde aus der Hüftkopfspongiosa der Patienten, die mit einer Hüftendoprothese versorgt waren, gewonnen. Dafür wurde zuerst die Spongiosa unter Verwendung eines sterilen scharfen Löffels ausgekratzt, und die Knochenstücke wurden daraufhin in einem 50 ml-Falcon eingesammelt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen aus den Knochenstücken mittels aktiven Spülens mit 10 ml PBS für 10 min gelöst, dann vollständig mittels einer 10 ml-Pipette aufgenommen und in den frischen Falcon überführt. Zu den Knochenstücken wurde Kollagenase-I-Lösung (50 mg/ 50 ml DMEM-Medium ohne Zusätze) zugegeben. Die Suspension wurde für 10 min auf dem 3D-Shaker bei 37° inkubiert. Anschließend wurden die Flüssigkeit mit resuspendierten Zellen vollständig aufgenommen. Mittels eines Zellsiebes (70 µm) wurden die verbleibenden groben Partikel entfernt. Die mit Collagenase I verdauten Knochenstückchen wurden noch zweimal mit dem Medium gewaschen und im Anschluss die filtrierten Zellsuspensionen in einem neuen Falcon vereinigt. Nach einem einmaligen Zentrifugiervorgang bei 160 xg über 5 min wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.2.2 Kultivierung von hMSCs

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter normoxischen Bedingungen in einem Brutschrank bei 37 °C. Am dritten Tag nach der Isolierung erfolgte der erste Mediumwechsel. Dafür wurden die Zellen vorher dreimal mit D-PBS gewaschen und

für die Dokumentation der Morphologie der Zellen regelmäßig mikroskopiert. Im Verlauf wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt.

2.2.2.3 Passagieren von hMSCs

Die isolierten hMSCs wurden bei einer Konfluenz von 90 % unmittelbar passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Zur Entfernung der Zellen von der Oberfläche wurden sie für 5 min bei 37 °C mit 1 x Trypsin/EDTA inkubiert. Nach Ablösung der Zellen durch Klopfen der Zellkulturflasche wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe der doppelten Menge an Kulturmedium gestoppt. Nach Bestimmung der Zelldichte unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in neuen Kulturflaschen mit einer Zelldichte von 1.000 Zellen pro cm^2 ausgesät und für weitere Experimente verwendet bzw. zur Konservierung eingefroren.

2.2.2.4. Bestimmung der Zelldichte

Für die Bestimmung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer wurde eine Zählkammer mit je 10 μl gut gemischter Zellsuspension gefüllt und wurden die Zellen in den vier Quadranten unter dem Mikroskop (Typ Diavert, Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Für die Zellzahlberechnung pro ml wurde der Mittelwert der zwei Kammern durch vier geteilt und mit dem Faktor 10^4 multipliziert.

2.2.1.5 Konservierung und Auftauen von mMSCs und hMSCs

Die Zellen wurden von der Oberfläche abgelöst und gezählt und dann für 5 min bei 500 xg bei RT zentrifugiert. Das Einfriermedium wurde nach Rezept vorbereitet (3.1.5) und vorgekühlt. Das Medium wurde vollständig abgesaugt und das Zellpellet in dem Einfriermedium mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml zügig resuspendiert. In die vorgekühlten und beschrifteten Kryoröhrchen wurde jeweils 1 ml Zellsuspension

gefüllt, und diese wurden sofort auf Trockeneis, das rechtzeitig vorzubereiten ist, gestellt. Die Lagerung erfolgte im Stickstofftank.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37 °C gehalten. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben. Nach Inkubation der Zellen über zwei bis vier Stunden bei 37 °C wurde zur Entfernung des DMSOs das Kulturmedium gewechselt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinisolierung aus mMSCs und hMSCs

Die Zellen wurden nach Standardprotokoll abgelöst (siehe oben) und zweimal mit D-PBS gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet im Report-Lysis-Puffer resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die bei -80 °C gelagerten Zelllysate wurden nach dem Auftauen auf Eis bei 4 °C für 5 min mit 400 ×g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Nanodrops. Die Proteinsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und im Gerät gemessen (A280-Methode)

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode ermöglicht die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe.

Die Gelzusammensetzung:

	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
H ₂ O	10 ml	5, 675 ml
Tris Puffer, 1 M	5 ml (pH8.8)	2,5 ml (pH6.8)
10 % SDS	200 µl	100 µl

10 % APS	200 µl	100 µl
30 % Acrylamid-Mix	5 ml	1,65 ml
TEMED	20 µl	10 µl

Tabelle 7. Gelzusammensetzung für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Mengenangaben für ein Gel mit den Maßen 7,5 cm x 8,5 cm und 1,5 mm Dicke wurden ausgerechnet.

Die Proteinlysate wurden mit 4 x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C im Thermomixer gekocht. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V, 2000 mA, 300 W in 1 × Laufpuffer durchgeführt.

2.2.2.4 Western Blot

Mithilfe dieses proteinbiochemischen Verfahrens wurden nach der elektrophoretischen Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf eine Membran bestimmte Proteine durch Immundetektion nachgewiesen.

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel gemeinsam mit Filterpapier und Schwämmen im Blottingpuffer kurz äquilibriert. Kurz vorher wurde die PVDF-Membran in Methanol eingetaucht und nach Abspülen mit dH₂O auch im Blotting-Puffer äquilibriert. Danach erfolgte die luftblasenfreie Aufschichtung in der Blottingkammer in folgender Reihenfolge: von unten nach oben ein Stoffschwamm, drei Filterpapiere, Membran, Gel, drei Filterpapiere, ein Stoffschwamm. Die zugeklappte Kammer wurde in den Tank gestellt und mit Blottingpuffer aufgefüllt. Über Nacht wurde bei 4 °C geblottet, wobei der Puffer mithilfe eines Magnetrührers gerührt wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran entnommen, dreimal über 5 min mit TBST gewaschen und anschließend eine Stunde mit 5 % Milchpulver in TBST blockiert. Die Membran wurde mit in mit 5 % Milchpulver in TBST verdünntem primären Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Die entsprechenden sekundären Antikörper wurden am nächsten Tag aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Detektion des HRP-Signals erfolgte mithilfe eines Entwicklers für Westernblot-Membran, Typ Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare, München).

Hierzu wurde auf die Membran 1 ml ECL-Lösung aufgetragen. Die Zeit der Entwicklungen wurde individuell angepasst.

Zum Nachweis des Haushaltsproteins Aktin wurden die Membranen gestrippt. Das Stripping eines Western Blots ist eine Methode, in der die Primär- und Sekundärantikörper von einem Western Blot entfernt werden. Ein Blot kann mehrmals gestrippt werden. Dafür wurden die Membranen in einem Glasgefäß in Stripping-Puffer eingelegt (3,57 ml 2-Mercaptoethanol, 100 ml SDS 10 %, 31,3 ml 1M Tris pH 6,8) und bei 50 °C 10 min in einem Brutschrank gerollt. Anschließend wurde die Membranen zweimal jeweils 10 min in TBST Lösung gewaschen und über eine Stunde mit Blockierungslösung (TBST + 5 % Milchpulver) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen über fünf Minuten in TBST wurde Anti- β -Aktin (Maus 1:10000) auf die Membran aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde, wie oben beschrieben, unter Verwendung des HRP-konjugierten sekundären Antikörpers (1:1000) die Immundetektion durchgeführt.

2.2.2.4 Bestimmung des Hyaluronangehalts im Knochen

Das Protokoll zur Bestimmung des Hyaluronangehalts im Knochen wurde in dieser Arbeit nach (Coulson-Thomas, Coulson-Thomas et al. 2015) etabliert.

2.2.2.5 Hyaluronanextraktion aus humanen Knochen

Für die Hyaluronangehaltsbestimmung wurden die Hüftköpfe nach Isolierung der hMSCs verwendet. Zuerst wurden Knochenzylinder, ca. 0,5 cm lang, mittels eines Bohrers hergestellt und der Knorpel und die Kortikalis entfernt. Der Knochen wurde unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und im Laborofen bei 60 °C über Nacht

getrocknet. Danach wurden von jeder Probe 20 mg Knochenpulver abgewogen und das Knochenpulver zusammen mit 1 ml Papainpuffer (125 µg/ml) in ein Mikrogefäß mit Metallkügelchen überführt. Die Suspension wurde dreimal über 50 sec homogenisiert, wobei die Proben zwischen den Zyklen für 15 sec auf Eis gekühlt wurden. Die gesamte Suspension (ca. 2 ml) wurde in ein verschließbares Gefäß überführt und anschließend Papain (125 µg/ml) in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugegeben. Die Suspension wurde in einem Thermoschüttler bei 60 °C für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.6 Hyaluronan-ELISA

Die Bestimmung des Hyaluronangehalts in den Knochenproben (s. 2.2.2.5) erfolgte mittels TECO-Hyaluronic-Acid-Plus-ELISA-Kit. Verdünnungen von Standards, Kontrolllösungen und Proben wurden in Eppendorfgefäßen angesetzt und jeweils 100 µl Ansätze in die Kavitäten der vorbereiteten Streifen in Duplikaten pipettiert. Anschließend wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 500 rpm inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Streifen dreimal mit jeweils 350 µl Waschpuffer gewaschen und auf einer trockenen und saugfähigen Unterlage ausgeklopft. Im nächsten Schritt wurde in allen Kavitäten je 100 µl HABP-HRP-Antikörperkonjugat pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Absaugen der Antikörperlösung wurden die Streifen fünfmal mit 350 µl Waschpuffer gewaschen und wie beim ersten Waschschrift ausgeklopft. Danach wurden jeweils 100 µl TMB in die Kavitäten pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Schüttler bei 500 rpm inkubiert, anschließend wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung gestoppt. Die Extinktionen wurden mithilfe eines ELISA-Readers bei 450 nm, mit einem Referenzfilter abgelesen und die Testergebnisse mittels einer ELISA-Gerät-Quantifizierungssoftware ausgewertet.

2.2.4 Immunodetektion von Proteinen in mMSCs und in hMSCs

2.2.4.1 Immunfluoreszenz-Färbung mit HAS-Antikörpern

Die Zellen wurden auf den autoklavierten Objektträger ausgesät, und nach ca. drei Stunden, als die Zellen angehaftet waren, wurden die Objektträger mit Medium bedeckt. Bei gewünschter Zellkonfluenz wurde die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zunächst wurde das Medium entfernt, die Zellen mit DPBS für 5 min gewaschen und mit 4 % PFA bei Raumtemperatur für 30 min fixiert. Nach einmaligen Waschen mit D-PBS wurden die Zellfelder mit DAKO-Pen umrandet und die Objektträger in 0,2 % Triton X-100 Lösung für 2 min eingetaucht. Die Zellen wurden zweimal mit D-PBS für 5 min gewaschen und mit 3 % BSA für 30 min bei 37 °C und dann mit 0,1 % BSA für 5 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Zellen wurden über Nacht mit Primärantikörper aufgetragen und bei 4 °C inkubiert.

Alle Primärantikörper wurden in 0,1 % BSA Lösung verdünnt.

Am nächsten Tag wurden die Primärantikörper entfernt. Die Zellen wurden in D-PBS sechsmal für 5 min gewaschen. Die Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen 1:400) wurden auf die Zellen aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit D-PBS und dH₂O wurden die Objektträger mit Prolong-Gold-Deckgläsern bedeckt.

2.2.5 FACS-Analyse

Mithilfe des FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) wurde die Expression der Oberflächenmarker der mMSCs analysiert. Dieser Verfahren stellt eine etablierte Methode zur Charakterisierung der MSCs dar.

Für die gesamte FACS-Analyse wurden ca. 5×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit Accutase StemPro abgelöst und gezählt. Die Zellsuspension wurde einmal bei 400 xg über 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,6 ml D-PBS resuspendiert und mit 100 ml auf die Eppis verteilt und auf Eis gestellt. Zu den Zellen wurden jeweils

10 µl FACS-Antikörper geben und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 1 ml D-PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet mit 200 µl kaltem D-PBS resuspendiert und in die FACS-Röhrchen überführt.

Antikörper	Synonym	Funktion	Vorkommen
Anti-Sca-1	Ly6A/E	T- und B-Zellaktivierung	Multipotente hämatopoetische Stammzellen
CD29	Integrin β 1	Zelladhäsion bei Zytokinese, Angiogenese	Leukozyten, Endothel, Epithel
CD44	Pgp-1	Adhäsion	Leukozyten
CD11b			Leukozyten
CD34	Mucosialin	Adhäsion	Hämatopoetische Stammzellen
CD45	LCA		
CD86	COD 86,B7 - 2	Ligand für T-Zelle, CD28 und CTLA-4	B-Zellen, Monozyten
Anti-MHC Class II	-	Antigenpräsentation	Zellmembran von Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen

Tabelle 8. Beschreibung der verwendeten FACS-Antikörper (MACS Milteny Biontec)

2.2.6. Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Isolierung von RNA aus mMSCs und hMSCs

Die Zellen wurden aus einer konfluent bewachsenen T25-Kulturflasche gewonnen. Die RNA-Extraktion erfolgte mittels RNeasy-Mini-Kit mit Qiashredder. Dazu wurden die

Zellen mit D-PBS einmalig gewaschen. Nun wurden die Zellen mit 350 µl RLT-Puffer mit 10 % β -Mercaptoethanol pro Kulturflasche lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellscraper abgelöst. Die Zelllysate wurden in QIA-Shredder-Tubes überführt und zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zu jedem Zentrifugat wurden 350 µl von 70 % Ethanol gegeben und je 700 µl in die RNeasy-Mini-spin-Säulchen überführt und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde entfernt, und die Säulchen wurden mit RW1-Puffer gewaschen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 sec bei 10.000 rpm wurde die genomische DNA mit 10 µl DNase I in 70 µl DNase Incubation Buffer (RDD Puffer) für 15 min bei Raumtemperatur verdaut. Anschließend wurde mit RW1-Puffer und zweimal mit RPE-Puffer zur Aufreinigung der RNA gewaschen. Zuletzt wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.6.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

RNA-Konzentrationen wurde im Nanodrop photometrisch bestimmt. Dieses Gerät ermöglicht das direkte Pipettieren von Proben auf eine optische Messoberfläche. Zunächst wurde der Leerwert mittels RNase-freiem Wasser eingestellt. Nachdem die Arbeitsoberfläche gereinigt worden war, wurde 1 µl der Probe darauf pipettiert und direkt gemessen.

2.2.6.3 cDNA-Herstellung

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA aus hMSCs oder mMSCs verwendet. In einer reversen Transkriptase-Reaktion wurde ein RNA-Template mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in einen komplementären DNA-Strang transkribiert. Hierzu wurde das Transcriptor-First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit von Roche verwendet. Das Volumen der eingesetzten RNA-Suspension richtete sich nach der zuvor ermittelten Konzentration der gewonnenen RNA. Es wurde jeweils 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben.

Der Reaktionsansatz bestand aus:

Komponente	μl
Nukleotid-Mix (dNTPs) (10mM)	2,0
PCR-Wasser	durch RNA Konzentration bestimmt
Random Hexamer Primer	2
Reaktionspuffer	4,0
Reverse Transcriptase	0,5
RNA	1,0
Rnase Inhibitor	0,5

Tabelle 9. Reaktionsansatz für cDNA Herstellung

Die RNA-Denaturierung erfolgte bei 65 °C über 10 min.; cDNA wurde bei 25 °C über 10 min, bei 50°C über 60 min und bei 85°C über 5 min synthetisiert.

2.2.6.4 Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (engl. Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die Vervielfältigung von einzelnen Abschnitten der DNA mit anschließender Analyse der gesuchten Komponenten. Diese Methode wurde für analytische Zwecke verwendet.

Der PCR-Ansatz setzte sich zusammen:

Komponente	μl
Template DNA	1,0
10 x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	0,4
Nukleotid-Mix (dNTPs) (10mM)	0,5
Sense-Primer (10pM/ μl)	0,5

Antisense-Primer (10pM/ μ l)	15,4
Taq-DNA-Polymerase	0,2
PCR-Wasser	15,4

Tabelle 10.PCR Ansatz

Alle Komponente wurde in PCR-Tubes auf Eis gemischt. Die Amplifizierung der DNA-Abschnitte im Thermocycler erfolgte nach einem Standardprogramm (10 min bei 25 °C, 60 min bei 50 °C, 5 min bei 85 °C, dann bei 8 °C Abkühlen). Für jedes Primerpaar wurde die Annealing-Temperatur bestimmt.

Bezeichnung	Sequenz (von 5' nach 3')	TM/°C
mHAS1_for	CTTTC AAGGCACTGGGCGAC	57 °C
mHAS1_rev	CACCGCTTCATAGGTCATCC	57 °C
mHAS2_for	ACAGGCACCTTACCAACAGGGTGT	66 °C
mHAS2_rev	GCATGCATAGATCAAAGTTCCCACG	66 °C
mHAS3_for	ACTGCCTTCAAGGCCCTTGG	60 °C
mHAS3_rev	AATGTTCCAGATGCGGCCAC	60 °C
mCD44_for	CCCACCATGGACCAAATGA	58 °C
mCD44_rev	GGTGCTCCGGATAAAGAAGGA	58 °C
mGAPDH_for	TGCAGTGGCAAAGTGGAGAT	62 °C
mGAPDH_rev	AGTGATGGCATGGACTGTGG	62 °C
hHAS1_for	GACTCCTGGGTCAGCTTCCTAAG	55 °C
hHAS1_rev	AAACTGCTGCAAGAGGTTATTCCT	55 °C
hHAS2_for	CATAAAGAAAGCTCGCAACACG	55 °C
hHAS2_rev	ACTGCTGAGGAATGAGATCCAG	55 °C
hHAS3_for	GACGACAGCCCTGCGTGT	58 °C
hHAS3_rev	TTGAGGTCAGGGAAGGAGAT	58 °C

eGFP_for	CAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC	62 °C
eGFP_rev	CACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGG	62 °C
hGAPDH_for	CAACTACATGGTTTACATGTTC	50 °C
hGAPDH_rev	GCCAGTGGACTCCACGAC	50 °C

Tabelle 11. PCR-Primer

2.2.6.5 Analyse des gebildeten HAs

Die Zellen wurden auf 24-Well mit 5 mM N-Acetyl-D-Glucosamin kultiviert. Nach drei Tagen wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration von Hyaluronan in Zellkulturüberstand mittels Hyaluronan-ELISA-Kit (s. 2.2.2.6) bestimmt.

2.2.6.6 Analyse der Adhäsion

Die Substratzugabe zu den Zellen erfolgte 24 h vor dem Start des Experiments. Nach 24 h wurden die Zellen mittels Accutase StemPro abgelöst und gezählt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet in einer Konzentration von 7.000 Zellen/ml resuspendiert. Jeweils 3 ml der Zellsuspension wurden in einem Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Die 6-Well-Titerplatten wurden vor dem Experiment mit HA von unterschiedlichem Molekulargewicht beschichtet. Die Wells wurden mit HA in verschiedener Konzentration beschichtet. Mittels dem Mikroskop Axiovert S100 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit 20-fach Phasenkontrastobjektiv inklusive einer Kammer (Pecon, Erbach, Deutschland) wurde die Zelladhäsion in einer Timelapseaufnahme verfolgt (60 Bilder/Stunde). Die Bestimmung des Zeitpunktes der Adhäsion, an dem die Zellen die ersten sichtbaren Ausstülpungen bildeten, wurde mittels FIJI-Software durchgeführt. Der Zeitpunkt, an dem 50 % der Zellen sich als adhärent erwiesen, wurde unter Verwendung der GraphPad-Prism-Software (GraphPad) berechnet.

2.2.6.6 Analyse der Ausbreitung der hMSCs

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte, wie im Kapitel 2.2.6.5 beschrieben. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, in einem Kulturmedium mit 10 mM GlcNAc

vorinkubiert. Die Kontrollzellen wurden mit 500 E/ml Hyaluronidase (HAse aus Rinderhoden, Sigma-Aldrich) für 1 h bei 37 °C und einem zusätzlichen Waschschrift gereinigt. Danach wurden Zellen auf 6-Well-Platten (Nunc) ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die 6-Well-Platten wurden mit BODIPY 581/591 SE (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) behandelt, einem Farbstoff, der an freie Aminogruppen über die Ausbildung von NHS-Ester bindet. Die Zellen wurden mithilfe des Axio-Observers Z1 (Carl Zeiss) aufgenommen. Pro Zelllinie, Behandlung und Zeitpunkt wurden zwischen 20 und 86 Zellen mit der FIJI-Software (s. 3.1.10) ausgewertet.

3.1.7 Statistik

Die statistische Auswertung der quantitativen Messungen erfolgte mit der Software GraphPad Prism 9 sowie R-Statistik (s. 3.1.10). Um die Ergebnisse auf statistische Signifikanz zu untersuchen, wurde der Student's t-Test für unverbundene Proben angewendet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $< 0,05$ betrachtet. Durchgeführt wurden die Experimente in mindestens zwei unabhängigen Durchgängen und jeweils in Duplikaten. Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte mit der Standardabweichung dar.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Isolierung der murinen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aufreinigung und Kultivierung von murinen mesenchymalen Stammzellen (mMSCs) in unserem Labor etabliert. Für die Endexperimente wurden neugeborene Mäuse verwendet.

Zunächst wurden zwei verschiedene Protokolle getestet. Zum einen wurden Zellen durch Ausspülung des Knochenmarks der Femorum und Tibiae isoliert. Zum anderen wurde diese durch eine Auswanderung der Zellen aus den im Medium kultivierten Knochenstücken, die vorher mit Kollagenase Typ II behandelt wurden, gewonnen. In weiteren Versuchen wurde auf die zweite Methode verzichtet, da die Zellausbeute sowie die Qualität der gewonnenen Zellen sehr gering waren. Bei der Isolierung der Zellen war es wichtig, die Kontaminationen durch andere Zellarten zu vermeiden. Dafür wurde vor der unmittelbaren Isolierung der Zellen aus den langen Knochen der vorderen und hinteren Extremitäten die Muskelreste und der Knorpel sorgfältig beseitigt. Um eine Kontamination mit Pilzen zu vermeiden, wurde ein Antifungizid (1000 U/mL Penicillin und 1000 µg/mL Streptomycin, Biochrom, Berlin, Germany) zugegeben.

Für die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung von mMSCs wurden im Laufe der Etablierung verschiedene Schritte des Protokolls optimiert. Die primäre Zellkultur wurde unter hypoxischen Bedingungen (2 % O₂; 5 % CO₂) kultiviert. Unter normoxischen Bedingungen konnten wir eine Veränderung der Zellmorphologie feststellen. Einige Zellen wurden immer größer, und andere kleine Zellen adhärirten auf diese Zellen. Für die Kultivierung der Zellen stellte sich DMEM/F-12, GlutaMAX™ Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % MSC geprüftes FBS (Invitrogen) als das beste Kultivierungsmedium heraus. Die mMSCs wurden in T25- sowie in T75-

Kunststoffflaschen kultiviert und expandiert. Unter den optimierten Kultivierungsbedingungen wurden die morphologischen Merkmale täglich anhand eines Lichtmikroskops überprüft und dokumentiert. Es konnten zwei verschiedene morphologische Formen beobachtet werden (**Abb. 4**). Einige Zellen waren lang, schmal und spindelförmig (A), andere Zellen waren breit und flach (mit roten Pfeilen markiert). Die Anzahl der Zellen der zweiten Form nahm mit steigender Passage zu. Diese Zellen wurden überdimensional groß.

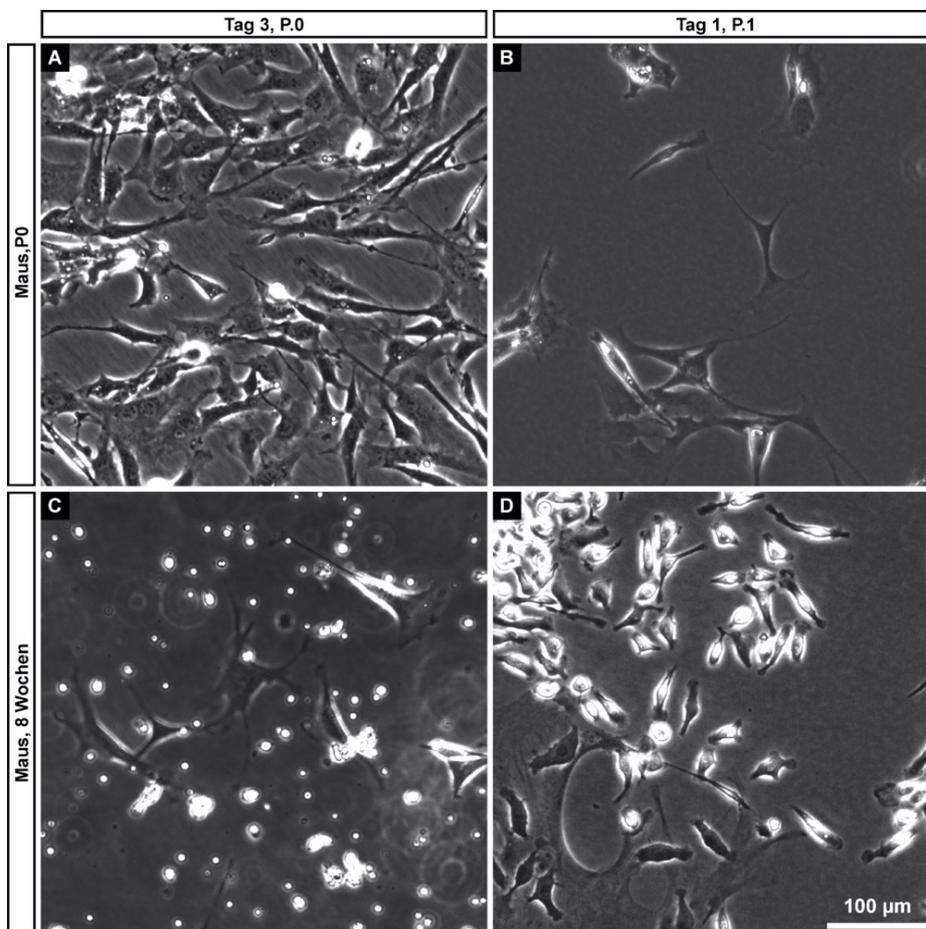


Abb. 2 Analyse der Morphologie der murinen mesenchymalen Stammzellen

3.2 Analyse des Oberflächenmarkerprofils der mMSCs

Die mesenchymalen Stammzellen aus allen Spezies weisen ein spezifisches Expressionsprofil von Oberflächenmarkern auf. Nach intensiver Literaturrecherche

wurden CD 44, CD29, Sca-1 als Positivmarker und CD86, CD45, anti-MHC II, CD 11b als Negativmarker für die murinen mesenchymalen Stammzellen ausgewählt. Das Expressionsprofil wurde unter Verwendung eines FACS (Fluorescence Activated Cell Scanning) analysiert. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte mMSCs derselben Passage verwendet. In **Abb. 5** sind die Expressionsprofile der verschiedenen Oberflächenmarker gezeigt. Positiv für die mMSC-assoziierten Marker CD44, CD105 Sca-1 sind 99,9 % bzw. 100 % der Zellen. Dass die Kurve des Expressionsprofils für CD 105 zwei Maxima aufweist, deutet auf zwei Zellpopulationen hin. Dies wurde auch bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Zellmorphologie beobachtet. Außerdem wurde keine Expression der hämatopoetischen Zellmarker CD86, CD45, anti-MHC II, CD11b nachgewiesen.

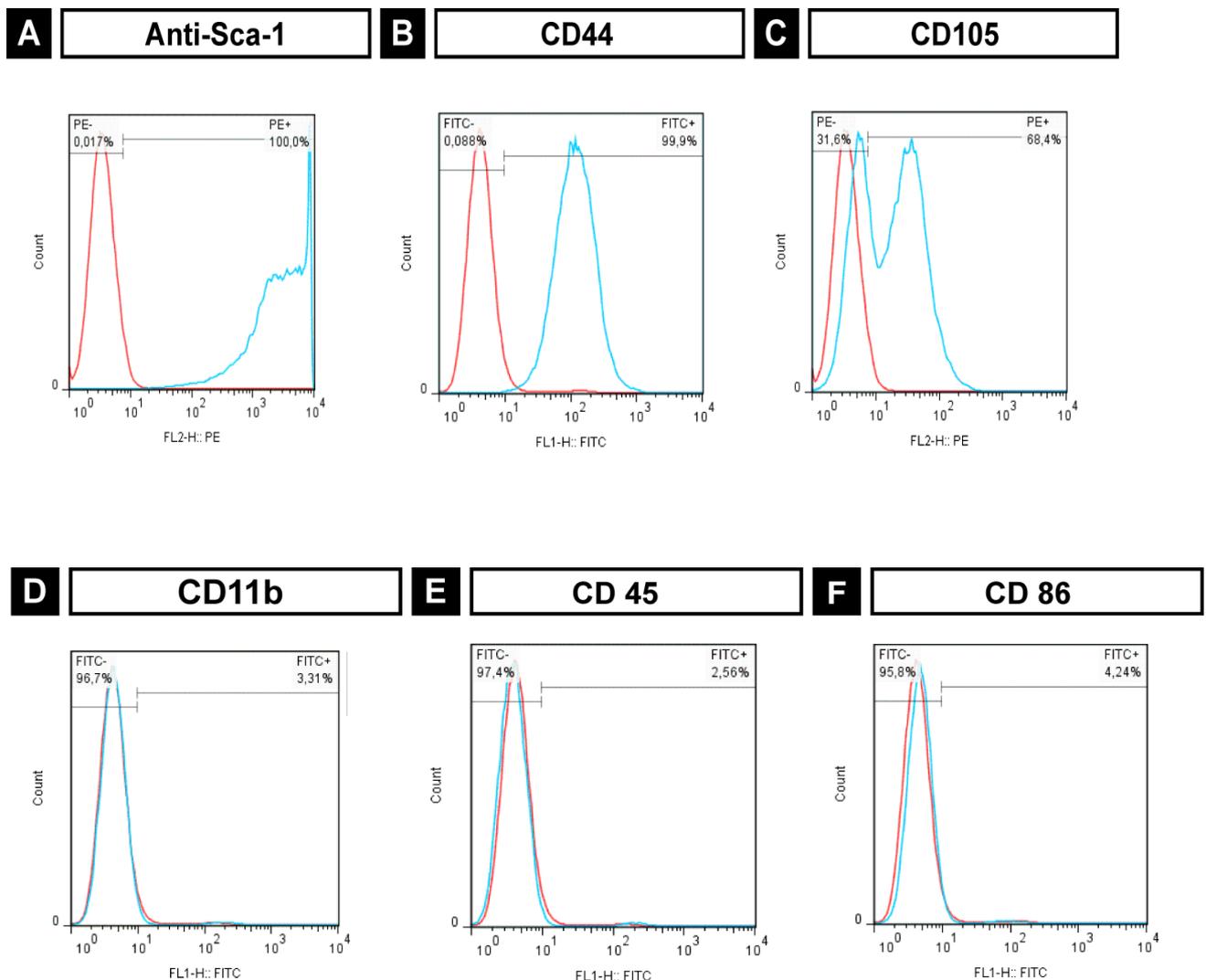


Abb. 3. FACS-Analyse des Expressionsprofils von Oberflächenmarkern der isolierten mMSCs: mMSCs sind für anti-Sca1, CD44 und CD105 positiv (A,B,C) und für die hämatopoetischen Marker CD11b, CD45 CD86 und anti- MHC II negativ (D,E,F).

3.3 Herstellung der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Zelllinien aus mMSCs

Zur Überprüfung des Stammzellcharakters der aufgereinigten Zellen wurden die mMSCs in die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung differenziert. Dazu wurden die isolierten Zellen in speziellen Medien mit etablierten Zusätzen (3.1.5) kultiviert.

Für die Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten wurden die isolierten mMSCs 14 Tage osteogen stimuliert. Anschließend wurde die Ablagerung von Kalzium mittels Alizarinrot-Färbung überprüft. Alizarinrot färbt zweiwertige Kationen in den mineralisierten Bereichen an (**Abb. 5 A**). Die Kontrollzellkultur, kultiviert ohne Differenzierungszusätze, wurde nicht angefärbt (**Abb. 5 B**).

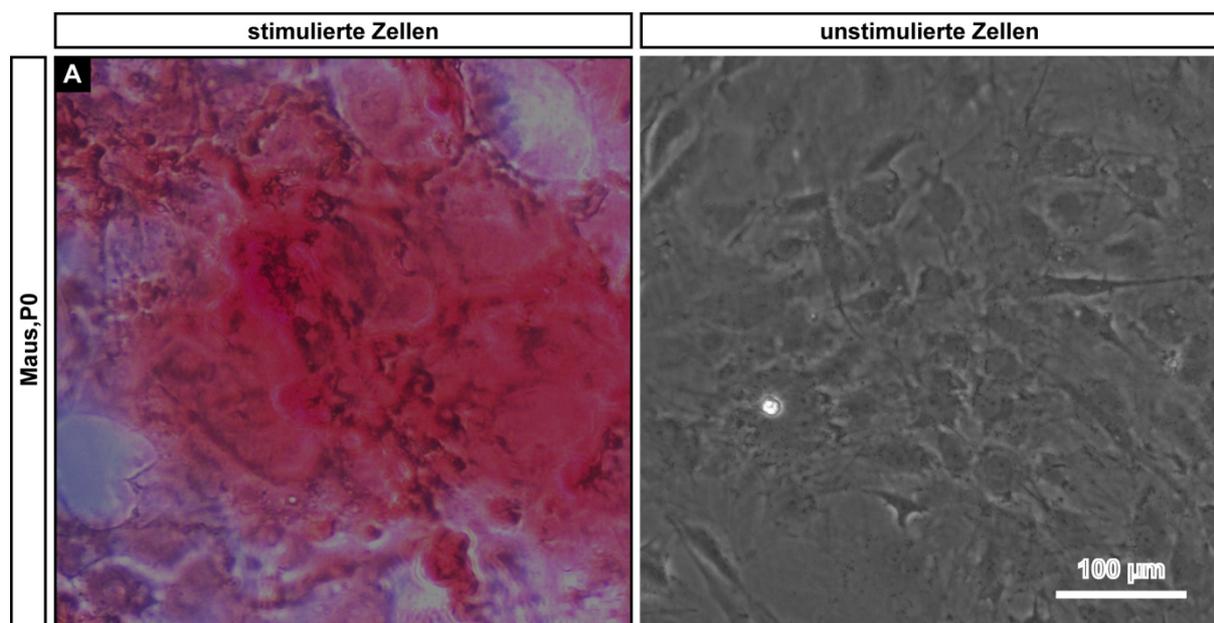


Abb. 4. Alizarin-Red-Färbung der osteogen differenzierten mMSCs (A) sowie der unstimulierten Kontrolle (B).

Nach einer 14-tägigen Stimulierung der isolierten Zellen in die adipogene Richtung wurden die gebildeten Fettvakuolen der differenzierten mMSCs durch Oil-Rot-O-Färbung nachgewiesen. Es zeigte sich nur in den adipogen differenzierten mMSCs

eine Rotfärbung der Fettvakuolen, die sich in den Adipozyten befinden. Die unstimulierten Kontrollzellen wurden nicht angefärbt.

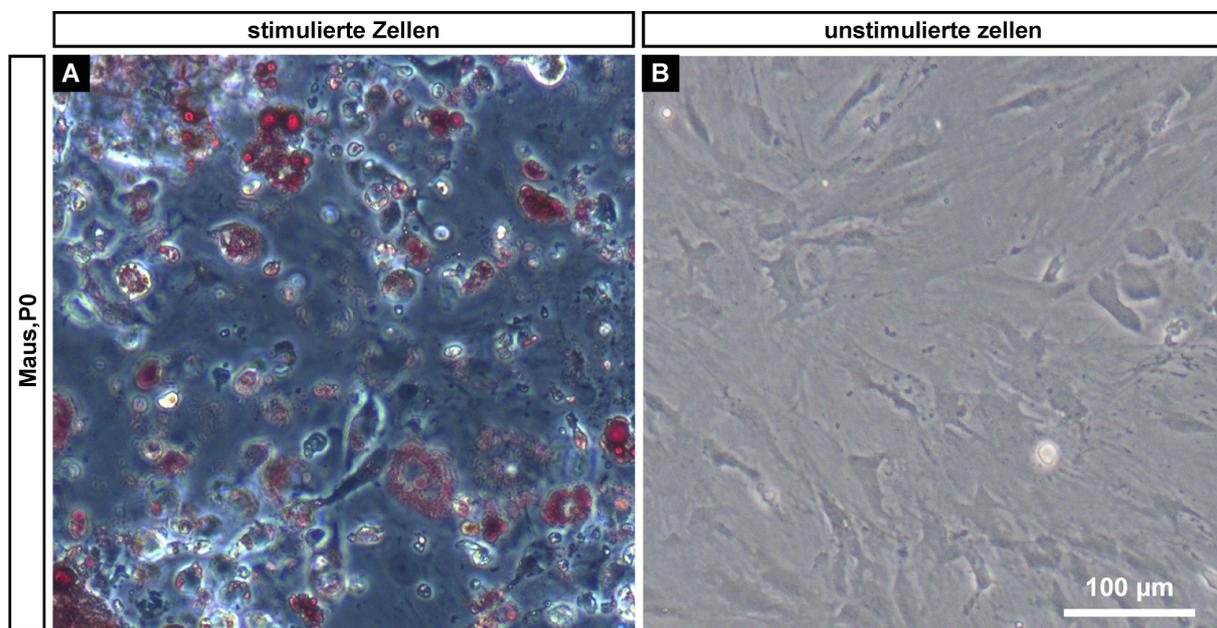


Abb.7. Oil-Red-O-Färbung von adipogen differenzierten mMSCs (A) sowie der unstimulierten Kontrolle (B)

Das chondrogene Differenzierungspotential wurde durch die sogenannte Micromass-Methode verifiziert. Zunächst war die Differenzierung über das Standardprotokoll, bei dem die Zellen in Pelletkultur chondrogen stimuliert werden, getestet worden. Allerdings stellte sich dies nicht als erfolgreich heraus, da die Zellen kein Pellet bildeten.

Deshalb wurden die mMSCs durch Zentrifugation in eine spezielle Form überführt und mit den notwendigen Zusätzen (s. o. „Chondrogenes Differenzierungsmedium“) kultiviert. Die Verifizierung der Differenzierung wurde mittels einer Alcianfärbung durchgeführt. Diese färbt die extrazellulären Proteoglykane sowie die Knorpelmatrix an (**Abb. 8**).

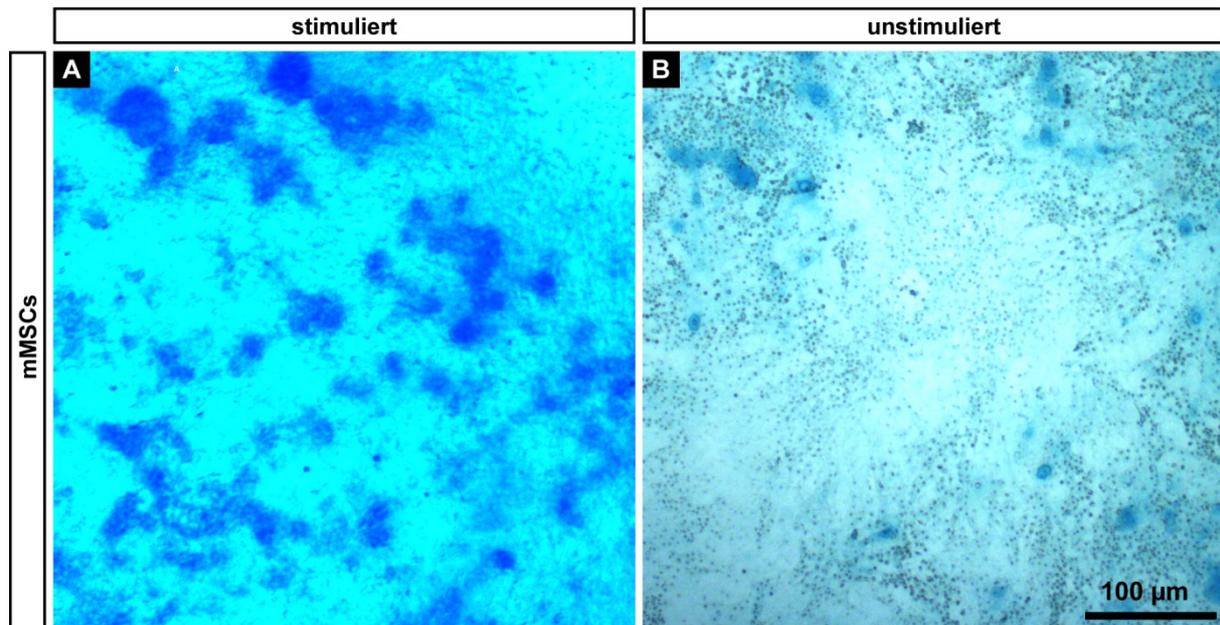


Abb. 5. Alcianfärbung der zu Chondrozyten differenzierten mMSCs (A), nicht stimulierte Zellen (B)

Die Experimente zeigten, dass die isolierten Zellen sich zu Osteoblasten, Adipozyten sowie Chondrozyten differenzieren können.

3.4 Untersuchung der Expression der Hyaluronansynthasen in den mMSCs

Die Expression der Hyaluronansynthasen HAS1, HAS2 und HAS3 wurde auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz analysiert. Hierzu wurden die aufgereinigten mMSCs, wie in 3.2.1.1 beschrieben, mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach dem weiteren Waschvorgang mit PBS und Blockierung mit BSA (3 % und 0,1 %) wurden die Primärantikörper (Kaninchen-anti-HAS1,-HAS2 und -HAS3) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Zellen fünfmal mit PBS und mit 0,1 % BSA gewaschen worden waren, erfolgte die Auftragung von Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen Alexa-Fluor 488). Als Negativkontrolle wurden die fixierten Zellen nur mit dem sekundären Antikörper behandelt. Bei dieser Probe wurden die Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop so gewählt, dass kein Fluoreszenzsignal detektiert wurde.

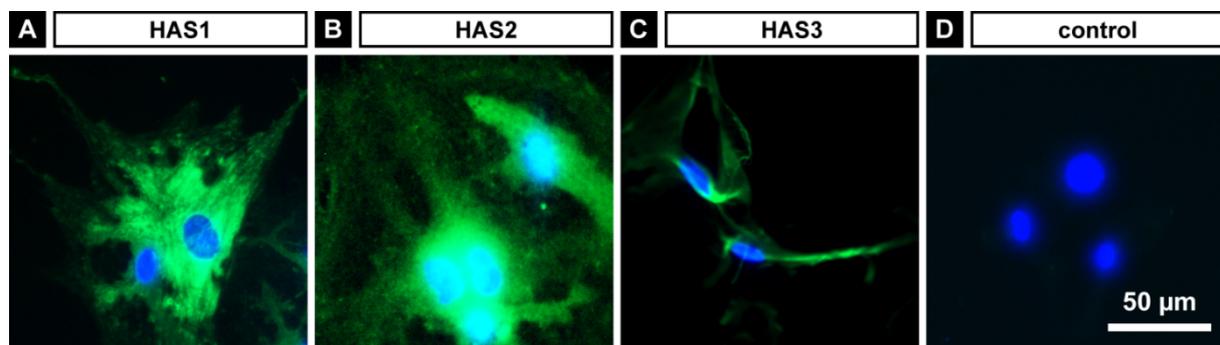


Abb. 6. Immunfluoreszenzanalyse der Expression der HAS-Enzyme (A: HAS1, B: HAS2, C: HAS:3, D: Zellen, die nur mit Sekundärantikörpern behandelt wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Die Untersuchung zeigt, dass die mMSCs alle drei HAS-Isoenzyme exprimieren. Die Fluoreszenzintensität könnte darauf hindeuten, dass HAS2 das am stärksten exprimierte hyaluronanbildende Enzym ist. Dagegen scheint HAS3 nur in geringen

Mengen exprimiert zu werden, was an der Funktion der Antikörper (primär sowie sekundär) liegen könnte.

3.5 Patientendaten

Um die Rolle des Hyaluronans bei der Entstehung der Osteoporose zu analysieren, untersuchten wir Knochenmaterial von Patientinnen, die nach einer Schenkelhalsfraktur in der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie eine Duokopfhüftprothesen-Implantation erhalten haben, (*Ethikantrag: 238-15*). Hierzu wurde die freiwillige Einwilligung der Patientinnen eingeholt und die Proben dem Labor anonymisiert weitergegeben. Die Einschlusskriterien waren: weiblich, über 18 Jahre alt, aufklärungs- und zustimmungsfähig. Die Patientinnen wurden nach ausführlicher Aufklärung sowie Erklärung ihres Einverständnisses auf HIV und Hepatitis getestet. Bei positivem Testergebnis wurden die Patientinnen aus der Studie ausgeschlossen. Es wurden der Hyaluronangehalt im Knochenmaterial bestimmt sowie humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmaterial isoliert. In die Studie wurden insgesamt 17 weibliche Spender eingeschlossen. Diese wurden in zwei Gruppen eingeteilt: klinisch nicht-osteoporotisch bzw. osteoporotisch. Für die Zuordnung der Patientinnen zu den Gruppen hatten wir eine makroskopische Beurteilung der Knochen, den T-Wert aus der DXA-Bestimmung, soweit vorhanden, sowie den Vitamin D-Gehalt verwendet. Es wurden Patientinnen im Alter von 62 bis 94 Jahren in die Studie eingeschlossen. Das durchschnittliche Alter der klinisch nicht-osteoporotischen Spender liegt bei 78,80 ($\pm 12,76$) Jahre und das der osteoporotischen Spender bei 80,63 ($\pm 9,18$) Jahre. Der T-Wert der Patientinnen mit klinisch bestätigter Osteoporose liegt durchschnittlich bei $3,11 \pm 0,88$. Nur bei zwei Spendern der nicht-osteoporotischen Gruppe wurde eine DXA-Messung durchgeführt. In die nicht-osteoporotische Gruppe wurden die Spender nach klinischen Faktoren (Knochenfrakturvorgeschichte, Familien-,

Lebensstilanamnese) sowie makroskopischer Beschaffenheit der Hüftkopfknochen eingeteilt. Der mittlere T-Wert liegt bei $-2,76 \pm 1,05$.

Variablen	Alle Spender N = 17	Osteoporose N = 8	Keine Osteoporose N = 9	P = Wert
Alter, Jahre, <i>mean, SD</i>	79,24 ± 10,91	80,63 ± 9,18	78,80 ± 12,76	0,6
T-Wert, <i>mean, SD</i>	-2,76 ± 1,05	-3,28 ± 0,83	-1,7 ± 0,43	0,019
Vitamin D (ng/ml), <i>mean, SD</i>	22,56 ± 14,65	21,42 ± 14,5	24 ± 16,07	0,8
Kalzium gesamt (2,1–2,55 mmol/l), <i>mean, SD</i>	2,0 ± 0,14	1,99 ± 0,16	2,01 ± 0,14	0,8

Tabelle 12. Patientendaten

3.6 Bestimmung der Hyaluronanmenge im Knochen von klinisch osteoporotischen Patientinnen sowie von klinisch nicht-osteoporotischen Patientinnen

Die Spongiosa aus den Hüftkopfknochen wurde durch Aufbohren gewonnen und dann gemörsert. Das gewonnene Knochenpulver wurde enzymatisch mit Papain verdaut, einer natürlichen Protease, die aus den grünlichen Schalen sowie den Kernen der Papaya gewonnen wird. Nach der Inkubation wurden die Überstände sorgfältig abgenommen. Die Hyaluronanmenge in den Überständen wurde unter Verwendung eines kommerziellen ELISA-Kits der Firma Tecomedical bestimmt. Der Hyaluronangehalt wurde pro 20 mg Knochengewebe berechnet (**Abb. 10**).

Liegt der Hyaluronangehalt in den osteoporotischen Knochen bei 8,61 (6,9) ng/mg, so ist er bei den nicht-osteoporotischen erhöht, hier wurden 15,88 mg/mg gemessen ($p = 0,09$).

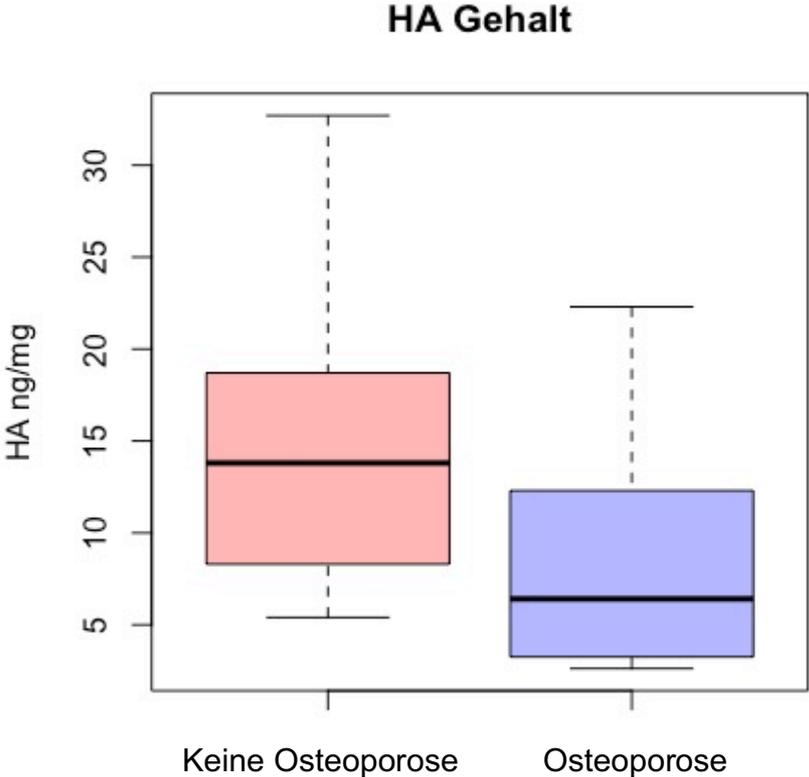


Abb. 7. Hyaluronangehalt in Knochen der nicht-osteoporotischen sowie osteoporotischen Patienten ($p = 0,09$)

3.7 Nachweis der Hyaluronansynthaseaktivität in den hMSCs aus den Spenderknochen

Für die Bestimmung der Aktivität der Hyaluronansynthasen wurden die aus dem Spendermaterial gewonnenen hMSCs in einem Medium, dem als Substrat der HASes 10 mM N-Acetyl-D-Glycosamin zugesetzt wurde, über 24 h inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgenommen und das in den Überstand abgegebene HA mithilfe eines kommerziellen ELISA-Kits (Tecomemedical) bestimmt. Nach der Abnahme des Mediums wurden die hMSCs mittels 4 % PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI-Farbstoff angefärbt. Die Zellzahl wurde anhand der mikroskopischen Bilder bestimmt und der HA-Gehalt im Zellkulturüberstand pro 10.000 Zellen berechnet.

Die hMSCs, die aus dem Knochenmaterial der osteoporotischen Spender isoliert wurden, geben 560,54 (\pm 571,89) ng HA pro 10.000 Zellen in den Zellkulturüberstand ab. Dagegen synthetisieren die hMSCs aus nicht-osteoporotischen Knochen mit 220,84 (\pm 99,01) ng pro 10.000. Die Unterschiede zwischen HA-Konzentration in beiden Gruppen war nicht signifikant ($p = 0,4$).

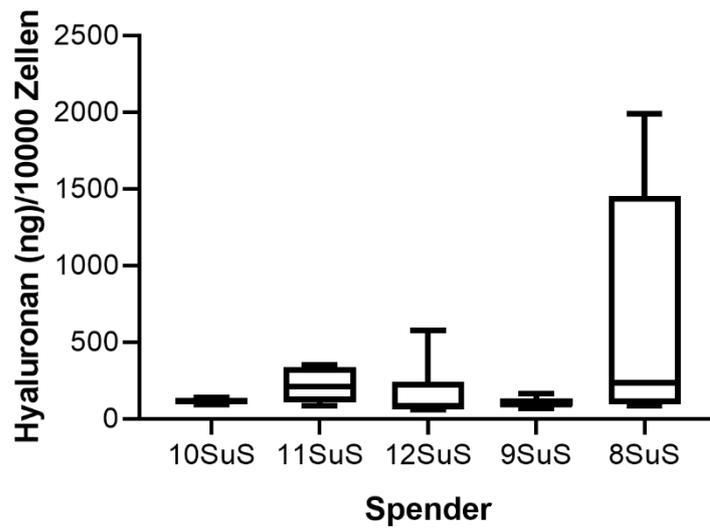


Abb. 8. Die Gesamtaktivität der Hyaluronansynthesen in den Zellen der osteoporotischen (9SuS, 8SuS), sowie nicht-osteoporotischen (10SuS, 11SuS, 12SuS) Patienten.

3.8 Untersuchung des Hyaluronan-Coats der osteoporotischen sowie nicht-osteoporotischen hMSCS

Für die Färbung des an die Zellen gebundenen HAs wurden die Zellen für 24 h mit 10 mM N-Acetyl-Glucosamin inkubiert und anschließend fixiert. Nach der Färbung des Hyaluronans mit biotinylierten Hyaluronabindeprotein und einem Alexa-Fluor-647-konjugierten Streptavidin wurden mikroskopische Bilder mittels eines Epifluoreszenzmikroskops angefertigt. Wir konnten eine wesentliche intrazelluläre Speicherung des Hyaluronans sowie einen sogenannten Hyaluronan-„Footprint“ der migrierten Zellen feststellen. Es konnte kein Unterschied in der Intensität der Fluoreszenzsignale bei dem Vergleich der hMSCs von osteoporotischen und nicht-osteoporotischen Spendern festgestellt werden (**Abb. 12**).

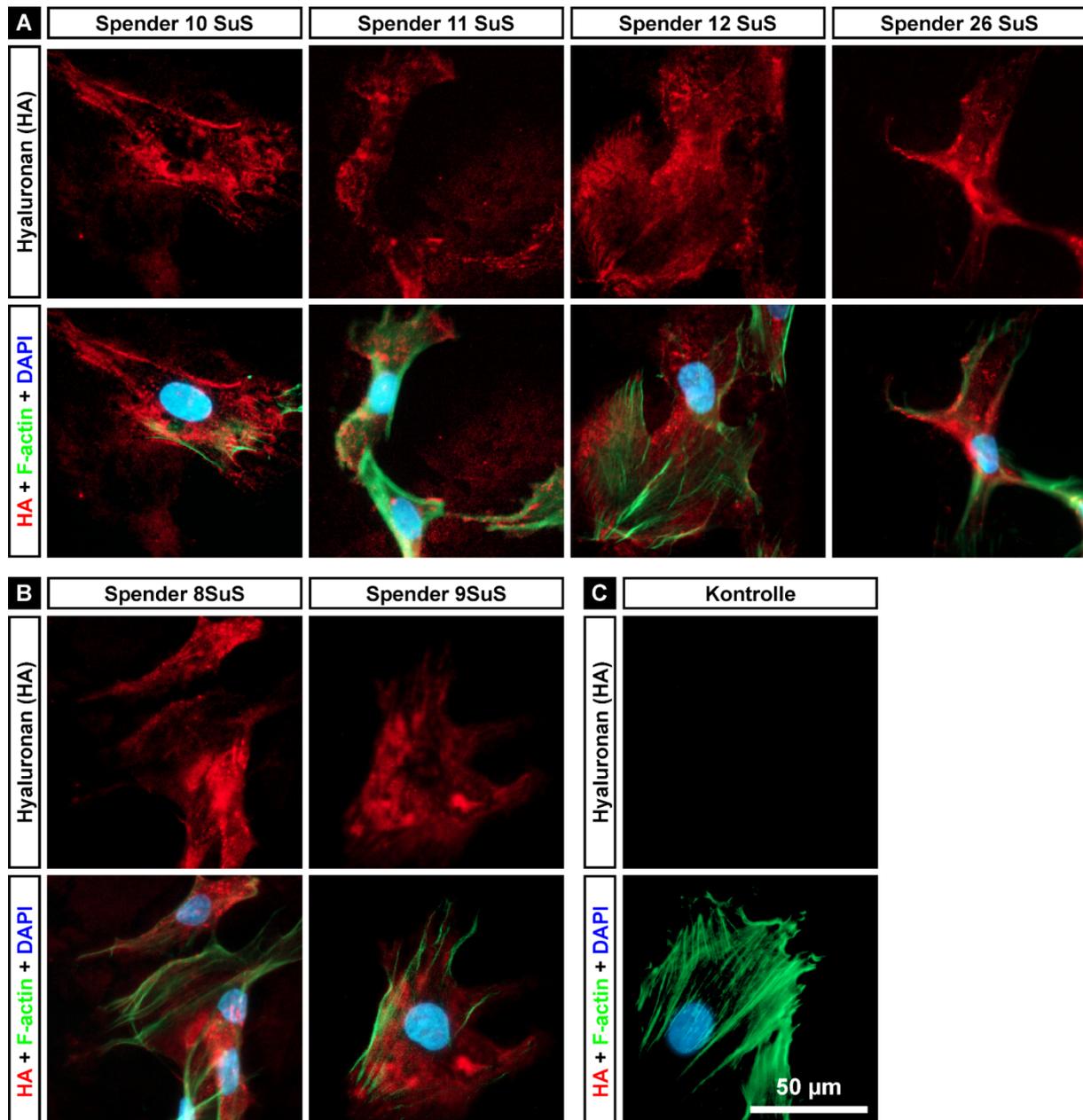


Abb. 9. Färbung des an die Zellen gebundenen Hyaluronans in den hMSCs von nicht-osteoporotischen (A) sowie osteoporotischen Patientinnen (B), Negativkontrolle (C). HA wurde mithilfe eines biotylierten HA-Bindeproteins (rot dargestellt) gefärbt. Aktin wurde mit einem Alexa-Fluor-488-konjugierten Phalloidin gefärbt (grün dargestellt). Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt (blau dargestellt).

3.9. Untersuchung der Expression von der Hyaluronansynthase HAS2 und dem Hyaluronanrezeptor CD44 der osteoporotischen sowie nicht-osteoporotischen hMSCs

Nach 24-stündiger Kultivierung der hMSCs in Gegenwart von 10 mM N-Acetylglucosamin wurden die hMSCs der verschiedenen Spender fixiert und mit primären Antikörpern gegen HAS2 und CD44 inkubiert. Der Vergleich der Fluoreszenzsignale zwischen den hMSCs aus der osteoporotischen und der nicht-osteoporotischen Gruppe zeigte keinen Unterschied in der Intensität. Auffällig ist die globuläre Struktur der blau dargestellten Fluoreszenzsignale des HAS2. Diese Strukturen scheinen tubulär angeordnet zu sein (**Abb. 13**).

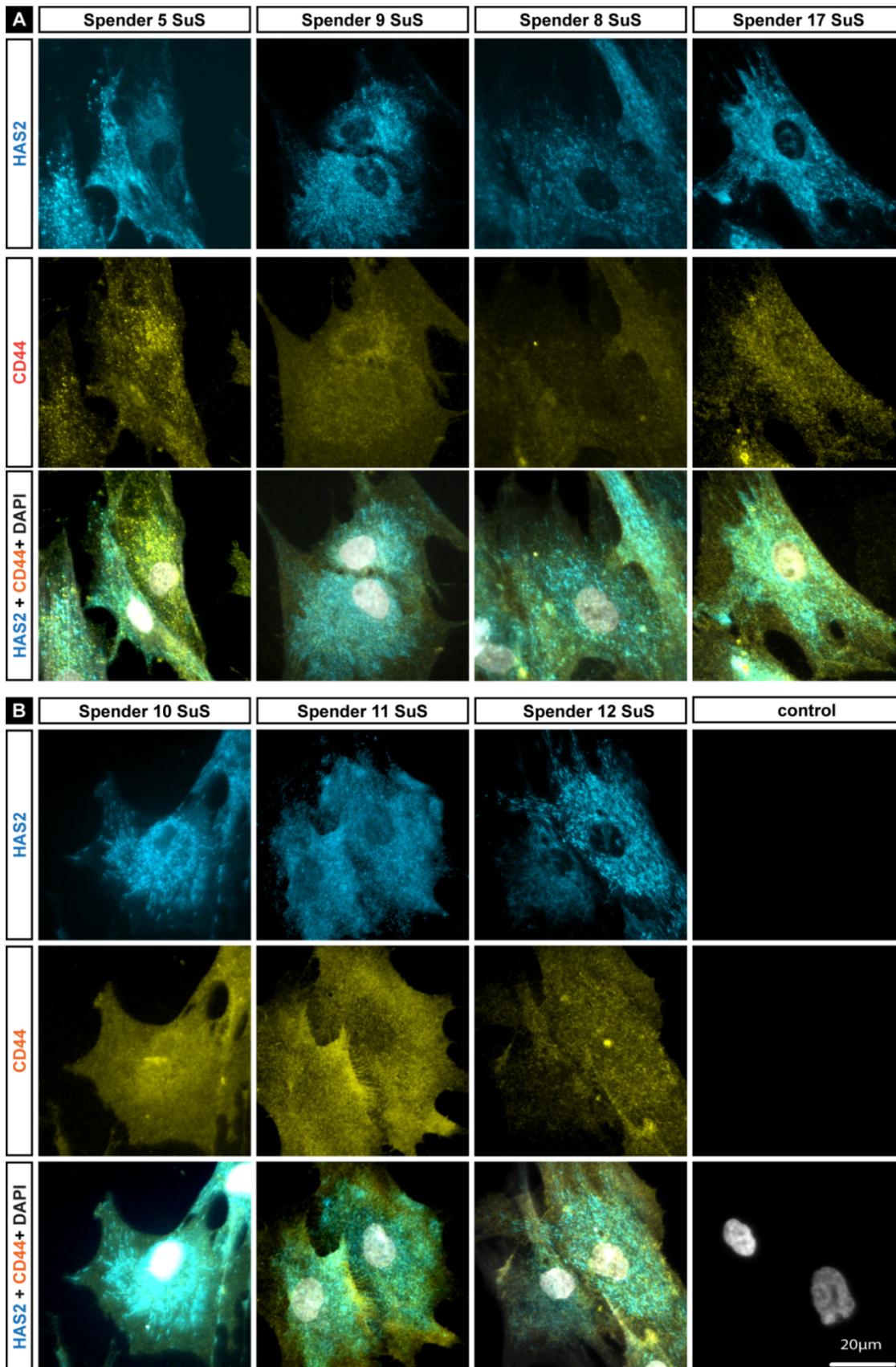


Abb. 13. Expression von der Hyaluronansynthase HAS2 und dem Hyaluronanrezeptor CD44 der osteoporotischen (A) sowie nicht-osteoporotischen hMSCs (B)

3.10 Der Einfluss des Hyaluronans auf die Adhäsionseigenschaften der SCP1-Zellen

Das HA könnte auf die Adhäsion sowie auf das Zell-Spreading der hMSCs in der Mikroumgebung des Knochens eine Rolle spielen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Adhäsion von immortalisierten hMSCs, den sogenannten SCP1-Zellen, auf Kunststoffoberfläche von 6-Well-Titerplatten, die mit HA unterschiedlichen Molekulargewichts (niedriges Molekulargewicht [NM]: ca. 50 kDa, ultraniedriges Molekulargewicht [UNM]: 4–8 kDa, hohes Molekulargewicht [HM]: > 950 kDa) beschichtet wurden, analysiert. Hierzu wurde der Adhäsionsvorgang mittels Time-Lapse-Mikroskopie mit 60 Bildern/h (bzw. 60 sec pro 1 Bild) verfolgt und ausgewertet. Als adhärenz wurden Zellen angesehen, wenn sie die ersten Zellausstülpungen ausbildeten. Der Prozentsatz an adhärenz Zellen wurde zu jedem Zeitpunkt bestimmt. Die Untersuchung zeigte, dass die Zellen am schnellsten auf einer Oberfläche, die mit UNM-Hyaluronan beschichtet wurde, adhärenz. Unter diesen Bedingungen adhärenz 50 % der Zellen innerhalb der ersten 12,5 min.

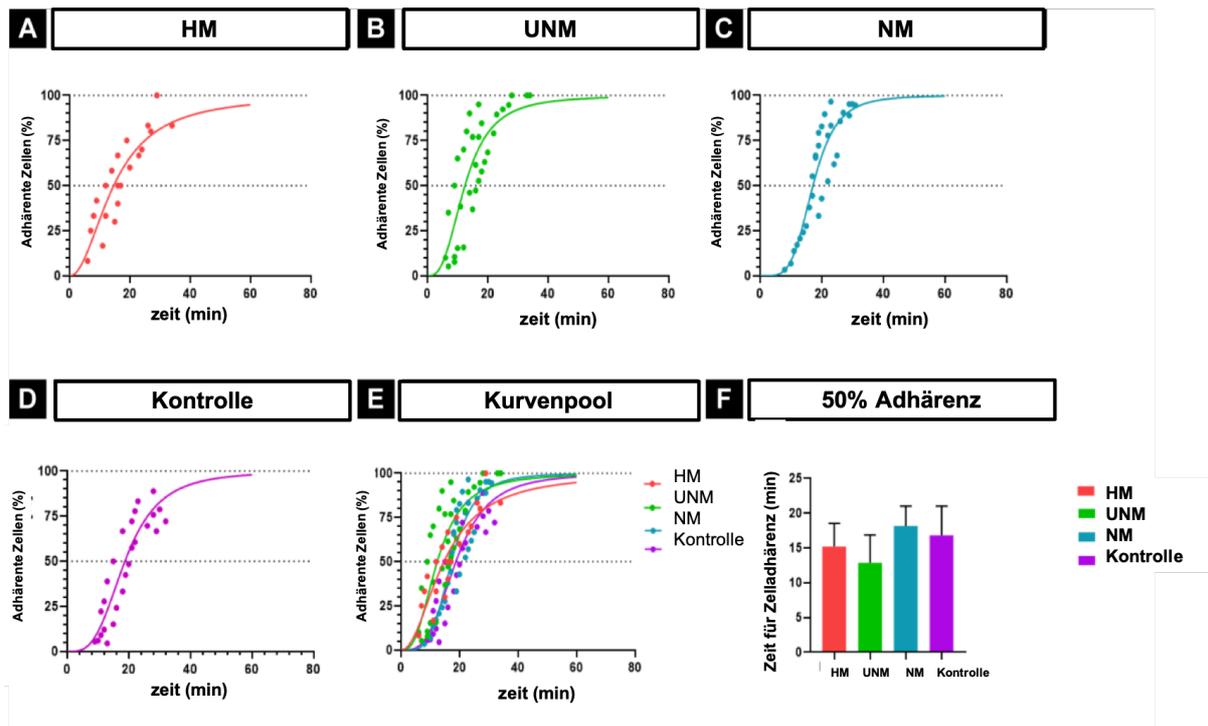
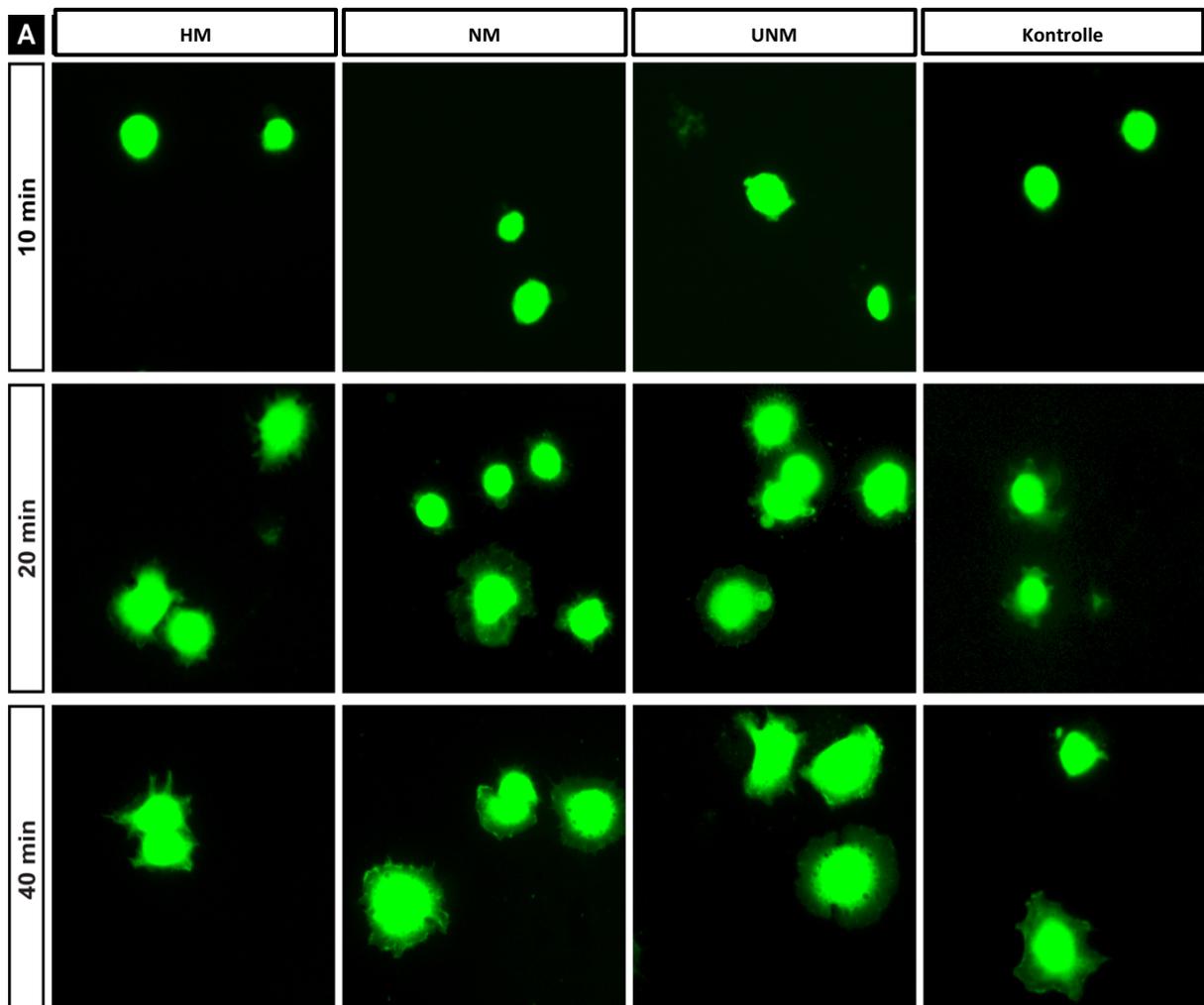


Abb. 10 Die Untersuchung der initialen Anheftung der SCP1-Zellen auf HA-beschichteten Oberflächen mittels Time-Lapse-Mikroskopie. Die Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen in Gegenwart von N-Acetylglucosamin für 24 Stunden kultiviert. Nach Ablösung der Zellen wurden sie sofort ausgesät. Die Zellanheftung wurde durch die Abbildung der ersten Zellausstülpungen erkannt. (A–D) Mittels sigmoidaler Vier-Parameter-Logistik nicht lineare Regression der Adhäsionseigenschaften der Zellen auf mit Hyaluronan unterschiedlichen Molekulargewichts (HM: > 950 kDa, kDa, UNM: 4–8 kDa und NM: ca. 50 kDa) beschichteter bzw. unbeschichteter Oberfläche. Die Punkte entsprechen mindestens einer einzigen Zelle, die zum jeweiligen Zeitpunkt adhärert. Es sind die Werte von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. (E) Überlagerungen der nicht linearen Regressionskurven der Zellen für die vier untersuchten Bedingungen. (F) Mittelwerte für 50 % adhärenzte Zellen. Die Werte wurden mittels sigmoidaler Vier-Parameter-Logistik für jedes der drei unabhängigen Experimente berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.

3.11. Der Einfluss des Hyaluronans auf die Zellausbreitung der SCP1-Zellen

In einem weiteren Experiment untersuchten wir die Wirkung der perizellulären HA-Schichten von SCP1 auf die Adhäsionseigenschaften während der Zellausbreitung. Die Zellen wurden auf einer mit HA unterschiedlichen Molekulargewichts beschichteten Oberfläche ausgesät.

Die Kontrollzellen wurden mit Hyaluronidase behandelt, um den perizellulären HA-Mantel zu entfernen. Die unbehandelten sowie die mit Hyaluronidase behandelten Zellen wurden in einem serumfreien Medium inkubiert. Nach 10, 20 und 40 Minuten wurden die Zellen fixiert und mit BODIPY 581/591 SE, das an freie Aminogruppen über NHS-Ester bindet, gefärbt. Die Fläche der mit Fluoreszenzmikroskopie aufgenommenen Zellen wurde mittels ImageJ bestimmt.



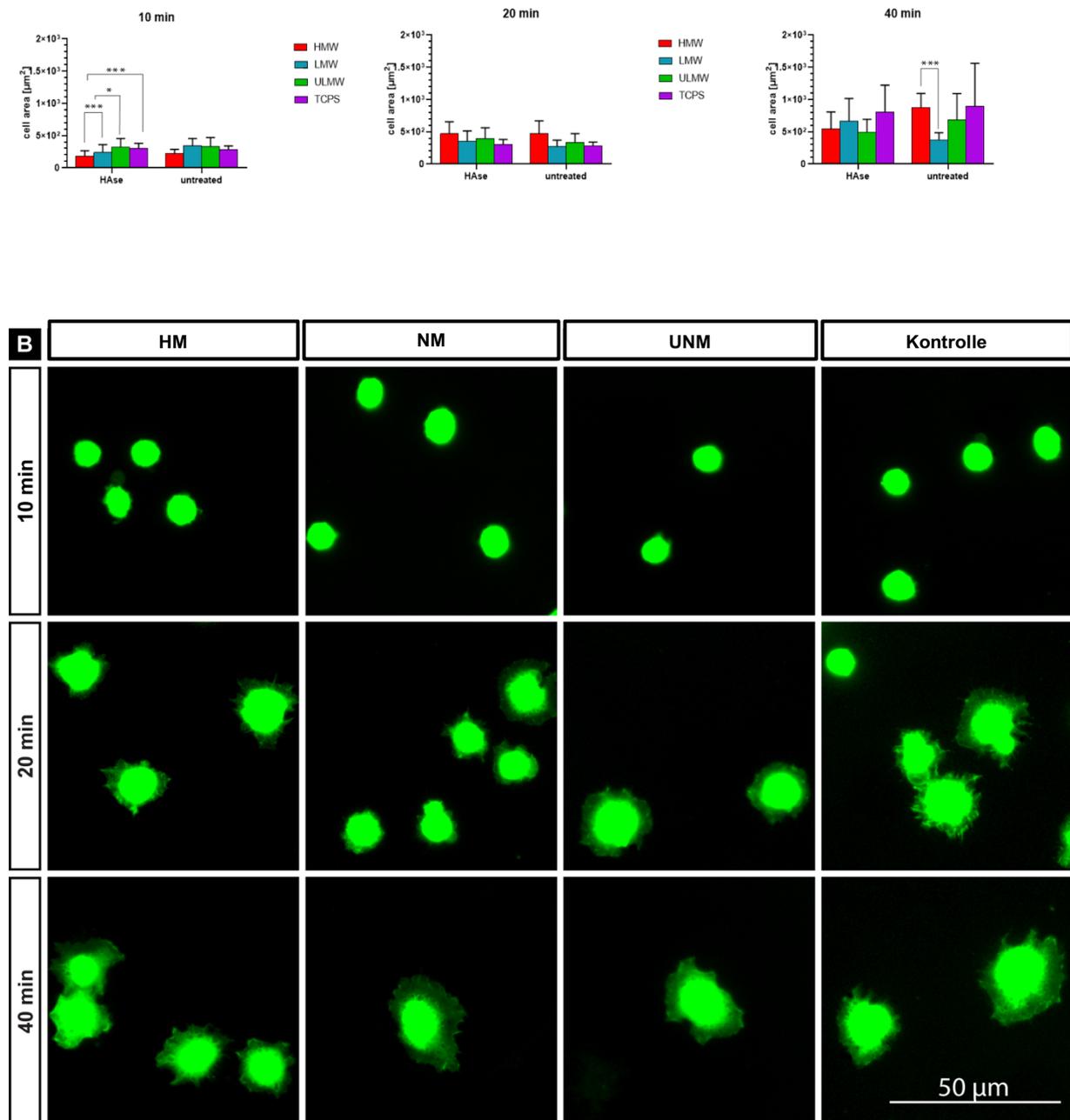


Abb. 11. Zellausbreitung von SCP1-Zellen auf Kunststoffoberflächen. Zellen mit (A) und ohne Hyaluronidase-(HAse)-Behandlung (B) wurden auf die Oberfläche von Zellkulturschalen unter serumfreien Bedingungen ausgesät und für 10, 20 und 40 min kultiviert. (A) Repräsentative Fluoreszenzbilder der mit BODIPY 581/591 SE gefärbten Zellen. (A–B) Dargestellt sind die mittlere Zelloberflächen 10, 20 und 40 min nach der Aussaat der unbehandelten Zellen (A) im Vergleich zu den mit HAse behandelten (B) Kontrollzellen.

Nach 10 min Inkubation waren bei allen untersuchten Bedingungen die meisten Zellen klein und kugelförmig. In Gegenwart von HM-HA waren die Zellen bei der Behandlung mit Hyaluronidase signifikant am wenigsten ausgebreitet. Diese Tendenz lässt sich auch ohne Behandlung mit Hyaluronidase beobachten (**Abb. 15**). Nach 20 min sind die Zellen ausgebreitet. Hier scheint die mittlere Zelloberfläche bei HMW-HA am größten zu sein. Die Behandlung mit Hyaluronidase scheint keinen Einfluss auf die Zellausbreitung zu haben. Nach 40 min sind die mittleren Zellflächen auf der Beschichtung mit LMW-HA am kleinsten. Die Behandlung mit Hyaluronidase scheint diesen Effekt aufzuheben.

4.Diskussion

4.1. Herstellung der mMSC-Zelllinie sowie Untersuchung der Eigenschaften von mMSCs

Die Etablierung der Aufreinigung und Kultivierung von murinen mesenchymalen Stammzellen war das primäre Ziel eines Teilprojekts meiner Arbeit. Dass das Hyaluronan bei der Entstehung von Knochenerkrankungen, z. B. Osteogenesis imperfecta (Oohira and Nogami 1989) sowie Osteoporose (Benisch, Schilling et al. 2012), eine Rolle spielt, ist bekannt. Ein Mausmodell könnte für diese Erkrankungen die Möglichkeit bieten, die verschiedenen Prozesse, die für die Entwicklung dieser Erkrankungen verantwortlich sind, *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Dafür sind vor allem die aus dem Mausmodell gewonnenen mMSCs als Mittel notwendig. Ebenso wie die hMSCs exprimieren die mMSCs HAS-Enzyme, die für die Synthese des Hyaluronans zuständig sind. Um für die *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimente eine ausreichende Menge an Zellen zu erhalten, muss im Labor ein möglichst effizientes Protokoll etabliert werden, das es erlaubt, möglichst schnell eine reine mMSCs-Kultur ohne Verlust des Stammzellcharakters und ohne Seneszenz zu erhalten.

Obwohl in der Literatur einige Protokolle zur Isolierung und Expansion von mMSCs beschrieben sind (Phinney, Kopen et al. 1999; Baddoo, Hill et al. 2003; Rosca and Burlacu 2010; Yew, Chang et al. 2013; Caroti, Ahn et al. 2017), zeigten unsere Erfahrungen während der Etablierung der Methode, dass die Herstellung der mMSCs sehr anspruchsvoll ist im Vergleich zu der Isolierung und Kultivierung von humanen, porcinen oder equinen MSCs. Für die Isolierung sowie Kultivierung erfordern mMSCs besondere Voraussetzungen. Dass die mMSCs bezüglich Umgebungseinflüsse empfindlicher als hMSCs sind, wäre denkbar. In der Literatur ist beschrieben, dass für eine effiziente Kultur physiologische *in-vivo*-Bedingungen nachgeahmt werden sollten (Boregowda, Krishnappa et al. 2012; Yew, Chang et al. 2013). Deshalb wurde die

Inkubation der Zellen stets unter einem hypoxischen Sauerstoffgehalt von 2 % in der Umgebung durchgeführt.

Generell kann für eine Optimierung der Proliferation auch das verwendete FBS entscheidend sein. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren kann ebenfalls die Proliferation der Zellen fördern. Fábíán et al. stellten fest, dass eine Kombination von bFGF und Hypoxie die Proliferation von humanen MSCs durch eine Aktivierung des ERK-Signalwegs und eine erhöhte Expression von HIF-1 α verbessern kann (Fábíán, Ramadurai et al. 2014). Die Literatur zeigte auch für mMSCs eine Kultivierung unter 5 % Sauerstoffgehalt und unter Zugabe von 10 ng/ml bFGF als effizient an (Caroti, Ahn et al. 2017). Im Laufe der Etablierung der Methode wurden deshalb verschiedene Medien sowie Zusatzkonstellationen getestet. Letztendlich wurden für die Isolierung sowie Kultivierung ein spezielles Kulturmedium sowie Zusätze, die die Teilung der Zellen zu fördern scheinen, verwendet. Dabei konnte kein wesentlicher Vorteil durch Zugabe von Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden. Für die weiteren Experimente wurden schließlich aus neugeborenen Tieren gewonnene Zellen verwendet. Diese Zellen wurden mithilfe des Mediums, unter Zugabe eines stammzellgeeigneten FBS, eines Hepes-Puffers, einer Lösung von Penicillin sowie Streptomycin und ohne Zugabe weiterer Wachstumsfaktoren unter geringem Sauerstoffgehalt in der Umgebung inkubiert. Für die Untersuchungen wurden die Zellen in der möglichst niedrigen Passage verwendet.

Wir haben auch erfolgreich versucht, die Zellen zu konservieren. Nach der Wiederaufnahme der mMSCs in die Kultur zeigten die Zellen keine wesentlichen Nachteile gegenüber den frisch aufgereinigten Zellen. Die Aufreinigung und *in-vitro*-Expansion der mMSCs stellten aufgrund der geringen Menge der gewonnenen Zellen und des unerwünschten Wachstums von nicht MSCs in der Zellkultur eine deutliche Herausforderung dar (Xu, De Becker et al. 2010).

Für die Aufreinigung der Zellen führten wir, wie in manchen Protokollen beschrieben wurde (Zhu, Guo et al. 2010), keine Depletion der immun- oder hämatopoetischen Zellen durch. Dies erwies sich als nicht notwendig, da die nicht-adhärenenten Zellen durch mehrfaches Waschen mit PBS und durch einmalige Passagiere effizient entfernt werden konnten. Auf diese Weise kamen die Zellen mit so wenig Fremdsubstanzen wie möglich in Kontakt. Außerdem wurden die Zellen so wenig wie möglich atmosphärischem Sauerstoffgehalt ausgesetzt.

Die spindelförmige, fibroblastenähnliche Morphologie der Zellen ist charakteristisch für mMSCs. Um die Zellen jedoch als MSCs definieren zu können, müssen diese eine Reihe von Kriterien erfüllen. Eines der wichtigsten Merkmale ist dabei das Differenzierungspotenzial (Pittenger, Mackay et al. 1999). Die aufgereinigten Zellen wurden mithilfe der etablierten Medien mit geeigneten Zusätzen in drei nach ISCT-Standards definierten Richtungen differenziert (Dominici, Le Blanc et al. 2006). Dabei konnte beobachtet werden, dass die mMSCs im Vergleich zu den MSCs anderer Spezies keine vollständige Konfluenz erreichten. Obwohl die mMSCs zum Zeitpunkt des Beginns der Stimulation keine 100%ige Konfluenz erreichten, konnten wir nach dem Beenden der Experimente durch Färbungen der Lipidvakuolen der Adipozyten, der Kalziumablagerungen der Osteozyten bzw. der Proteoglykane der Chondrozyten alle Merkmale der drei Zelllinien erfolgreich nachweisen. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Zellen, die aus verschiedenen Mauslinien gewonnen wurden, nicht gleich leicht zu Adipozyten, Osteozyten sowie Chondrozyten differenziert werden können. Auch zeigen sich in der Proliferation weitere Unterschiede (Peister et al. 2004; Ren et al. 2009; Meisel et al. 2011). Zu den weiteren Kriterien zählen die Plastikadhärenz sowie die Abwesenheit der hämatopoetischen sowie endothelialen Zellmarker (Abdi et al, 2008; Sivasubramaniyan et al. 2012). Für die Identifizierung der hMSCs sowie mMSCs wurde bereits eine Reihe Oberflächenzellmarker

vorgeschlagen. Für hMSCs wurden Stro-1, SSEA-4, CD 271 und CD146 (Park, Jeon et al. 2013; Lv, Tuan et al. 2014) vorgeschlagen. In zahlreichen Studien wird über einen fibroblastischen oder perizytischen Ursprung der MSCs berichtet (Lv, Tuan et al. 2014). Das Oberflächenzellmarkerprofil der mMSCs unterscheidet sich von dem der hMSCs.

Um das Expressionsprofil der Oberflächenmarker der mMSCs zu überprüfen, führten wir eine FACS-Analyse durch. Positiv für die mMSC-assoziierten Marker CD 44, CD29, Sca-1 waren 99,9 bzw. 100 % der Zellen. CD44 ist der Rezeptor von Hyaluronan und konnte in Studien überwiegend auf mMSCs nachgewiesen werden (da Silva Meirelles, Chagastelles et al. 2006; Zheng, Cao et al. 2006; Kolf, Cho et al. 2007). CD-29 ist die β 1-Untereinheit eines Integrins, das jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht und für Zell-Matrix-Interaktionen verantwortlich ist; und CD-20 gilt ebenso als Marker für mMSCs (Soleimani and Nadri 2009). Sca-1 ist ein Proteoglykan, das auf unreifen Zellen exprimiert und in der Literatur als Oberflächenmarker von mMSCs beschrieben wird (Eslaminejad, Nadri et al. 2007; Hachisuka, Mochizuki et al. 2007). Außerdem wurde keine Expression der hämatopoetischen Zellmarker CD86, CD45, Anti-MHC II, CD 11b (Zhu, Guo et al. 2010) nachgewiesen. Dies spricht für den multipotenten Charakter der hergestellten Zellen.

Die aus den Wildtyptieren isolierten Zellen exprimieren alle drei HAS-Enzyme auf Proteinebene. Das konnte problemlos mittels Immunfluoreszenz- sowie Western-Blot-Methode nachgewiesen werden. Für die künftig geplante Untersuchung der Rolle von HA in der Knochenmikroumgebung ist dies entscheidend.

4.2.Charakterisierung von hMSCs aus osteoporotischen und osteopenen Patientinnen

Um die putative Rolle des Hyaluronans in degenerativen Knochenerkrankungen zu untersuchen, wurden humane mesenchymale Stammzellen aus den explantierten Hüftköpfen von osteoporotischen sowie osteopenen Patientinnen aufgereinigt und kultiviert. Obwohl von verschiedenen Spendern zeigten die hergestellten Zellen keine besonderen Unterschiede, trotz unterschiedlichen Alters der Patientinnen sowie unterschiedlicher makroskopischer Beschaffenheiten des Knochenmaterials. In der letzten Zeit wird zunehmend diskutiert, ob die mesenchymalen Stammzellen tatsächlich als Stammzellen bezeichnet werden können. Im Rahmen der Stammzelltherapie wird von einigen Wissenschaftlern gefordert, den Begriff „mesenchymale Stammzellen“ in „medizinische Signalzellen“ umzubenennen (Pittenger, Mackay et al. 1999; Siris, Adler et al. 2014). Dadurch könnte die Funktion dieser Zellen besser wiedergespiegelt werden: Diese Zellen wirken vermutlich nicht direkt durch Selbstdifferenzierung, sondern durch Freisetzung von Mediatoren- und bioaktiven Substanzen sowie immunmodulatorisch und regenerativ an den Verletzungs- und Defektstellen. Bei der therapeutischen Anwendung von MSCs werden die patienteneigenen- und gewebespezifischen Stammzellen, die das neue Gewebe aufbauen, durch bioaktive Faktoren stimuliert, welche von außen zugeführte medizinische Signalzellen sezernieren können. Der Name „Stammzellen“ führt also zu Missverständnissen. Bisher wurde allgemein angenommen, dass solche Zellen, die *in vitro* kultiviert wurden, direkt in einem geschädigten Gewebe zu regenerierenden Zellen sich differenzieren und direkte „Reparaturen“ durchführen können. Caplan et al. schlagen aus diesem Grund vor, den Begriff der MSCs in „medizinische Signalzelle“ zu ändern (Caplan 2017). Dieser neue Begriff könnte den tatsächlichen Beitrag der MSCs bei der Stammzelltherapie verdeutlichen. Für die Verwendung von hMSCs gibt

es verschiedene Einsätze. Die allogene Knochenmarktransplantation kann zu einer Regenerierung der mesenchymalen Vorläuferzellen führen. Es eröffnet neue Möglichkeiten in der Behandlungsstrategie von degenerativen Knochenerkrankungen und vor allem in der Therapie der Osteogenesis imperfecta (Horwitz, Prockop et al. 1999).

4.3 Der Hyaluronangehalt in den Knochen

In Vertebraten kommt HA in allen Geweben und Körperflüssigkeiten vor. In der Ratte wurde etwa die Hälfte des gesamten Hyaluronangehalts in der Haut und ein Viertel im Skelett und in den Gelenken gefunden (Reed, Lilja et al. 1988; Fraser, Laurent et al. 1997). Dass der Hyaluronangehalt in den Knochen von Patienten mit Osteogenesis imperfecta um das 1,5–3-fache erhöht ist, wurde in der Literatur beschrieben (Oohira and Nogami 1989). Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob die Knochen von Patientinnen, die an Osteoporose leiden, einen im Vergleich zu gesunden Knochen veränderten Hyaluronangehalt aufweisen. Hier wurde der Hyaluronangehalt direkt im Spongiosaknochen untersucht. Hierzu wurden vier bis fünf Knochenzylinder mit einer Länge von ca. 1 cm aus verschiedenen Stellen der Spongiosa des Femurkopfs gewonnen. Dadurch konnte eine Bestimmung der durchschnittlichen Hyaluronanmenge im Knochen des Hüftkopfes durchgeführt werden.

Der mittlere Hyaluronangehalt im gesunden Knochen betrug 15,88 (9,73) ng/mg und im osteoporotischen bzw. osteopenen Knochen im Mittel 8,01 (6,9) ng/mg. Damit ist der Hyaluroangehalt im osteoporotischen Knochen zwar niedriger, allerdings konnten wir keinen signifikanten Unterschied feststellen ($p = 0,09$). Dies könnte daran liegen, dass uns die Baseline-Patientencharakteristika, z. B. Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme, Lebensstil, Ernährungsgewohnheiten, nicht bekannt sind. Die Menge an Hyaluronan kann sowohl intern als auch extern beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass die Menge an Vitaminen, Mineralien (z. B. Vitamin D und Kalzium), andere Erkrankungen, der Lebensstil (z. B. hormonabhängige Tumore oder Alkoholismus) und die Einnahme verschiedener Medikamente (z. B. Alendronsäure oder Heparin) positiv oder negativ die Knochenstruktur sowie die Funktion der hMSCs beeinflussen können. Soweit uns bekannt ist, wurde deren Einfluss auf den

Hyaluronangehalt in der Spongiosa nicht untersucht. Sowohl die Substitution von Colecalciferol, Kalzium wie auch eine Behandlung der diagnostizierten Osteoporose mit Alendronsäure-Präparaten und Parathormon beeinflussen die Knochenhomöostase und – möglicherweise auf einem indirekten Weg – auch die HA-Produktion. Der HA-Gehalt ändert sich im Laufe des Lebens (Fedarko, Vetter et al. 1992).

Der Hyaluronangehalt in den Knochen der Ratte beträgt 0,28 ng/mg Hyaluronan. Dabei wurde das Hyaluronan aus den Knochen isoliert, nachdem die Tiere eingefroren worden waren (Reed, Lilja et al. 1988; Fraser, Laurent et al. 1997). Im humanen Knochen scheint der Hyaluronagehalt hingegen deutlich höher zu sein. Die gesamte Menge an Hyaluronan im langen tubulären Knochen von Kindern im Alter von acht Monaten bis 12 Jahren beträgt 35–50 ng/mg Nassgewicht. Dagegen haben 8–12-jährige Kinder, die an Osteogenesis imperfecta leiden, einen Hyaluronagehalt von 70–100 ng/mg (Oohira and Nogami 1989). Im normalen femoralen Knochen einer 65-jährigen Patientin beträgt der Hyaluronangehalt 61 ng/mg Trockengewicht (Mania, Kallivokas et al. 2009). Dies entspricht in etwa der Größenordnung unserer Ergebnisse.

Der im Vergleich zum gesunden Knochen niedrigere Hyaluronangehalt im osteoporotischen Knochen könnte auf eine Dysbalance im Hyaluronan-Metabolismus hindeuten und letztendlich die Mineraldichte des Knochens beeinflussen. Bei Osteoporose könnten von Hyaluronan abhängige Reorganisationen eine wichtige Rolle spielen, da Microarray-Analysen einer Herunterregulation der Genexpression des Hyaluronanrezeptors *RHAMM* in osteoporotischen hMSCs im Vergleich zu gesunden hMSCs zeigte. Eine niedrige Knochenmineraldichte und Schädigungen im μ m-Bereich sind charakteristisch für primäre Osteoporose. Osteoporotische Patienten sind einem erhöhten Risiko ausgesetzt, Frakturen zu erleiden. Eine abgeschwächte Expression des *RHAMMs* könnte einerseits verantwortlich sein für die verminderte

Migrationskapazität und Rekrutierungsfähigkeit der osteoporotischen hMSCs und andererseits die Frakturheilung von osteoporotischen Knochen erschweren (Benisch, Schilling et al. 2012). Zudem ist die Expression der Hyaluronidase *HYAL1* in Osteoklasten auf ihre Differenzierung hin hochreguliert und folglich der *HYAL1*-abhängige Abbau von Hyaluronan in Osteoklasten verstärkt. Dies ist ein Hinweis, dass *HYAL1* eine entscheidende Rolle im Knochenumbauprozess spielt (Puissant and Boonen 2016). Wenn die Aktivität der Osteoklasten bei Osteoporose verstärkt ist, beobachteten wir, dass der Hyaluronangehalt im osteoporotischen Knochen reduziert ist. Das ist ein weiterer Hinweis für eine mögliche regulatorische Rolle von Hyaluronan im Knochenumbauprozess. Eine bessere Aussage über die Bedeutung von Hyaluronan bei Osteoporose wäre möglich, wenn künftig in Studien eine größere Anzahl an Patientinnen eingeschlossen werden.

4.4. Expression und Aktivität der Hyaluronansynthasen in den hMSCs

Aus der Literatur ist bekannt, dass hMSCs, die aus dem Knochenmark stammen, Hyaluronansynthaseaktivität aufweisen und einen perizellulären Hyaluronanmantel bilden. Dabei exprimieren die hMSCs alle drei HAS-Isoenzyme (HAS1, HAS2 und HAS3), wobei HAS2 den höchsten und HAS3 den niedrigsten Expressionslevel aufweist (Qu, Rilla et al. 2014; Reiprich, Akova et al. 2021). Verantwortlich für die Zielsuche und Ansiedlung der Stammzellen in ihrer Nische könnte der Hyaluronanmantel der hMSCs sein (Reiprich, Hofbauer et al. 2020). Er könnte auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Stammzellendifferenzierung spielen, da der Hyaluronanmantel mit dem Differenzierungsstatus der Stammzellen und Vorläuferzellen korreliert (Nilsson, Haylock et al. 2003; Ellis, Grassinger et al. 2011; Qu, Rilla et al. 2014).

Da in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass der Hyaluronangehalt im osteoporotischen Knochen reduziert zu sein scheint, wird hier untersucht, ob die hMSCs aus osteoporotischen und nicht-osteoporotischen Spendern sich in der Hyaluronansynthaseaktivität unterscheiden.

Dazu wurden die hMSCs mit dem HAS-Substrat N-Acetyl-D-Glucosamin für 24 h inkubiert, und anschließend wurde der Hyaluronangehalt im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Außerdem wurde das perizelluläre HA unter Verwendung eines biotinylierten Hyaluronanbindepotein angefärbt. Zudem wurde die Expression vom abundanten HAS2 mittels Immunfluoreszenz gefärbt.

Die Immunfluoreszenzfärbung von HAS2 lässt darauf schließen, dass zwischen hMSCs aus osteoporotischen und aus nicht-osteoporotischen Spendern kein Unterschied der Expressionslevel auf Proteinebene existiert.

Es gab keine signifikanten Unterschiede bei der HA-Sekretion in den Zellüberständen ($p = 0,4$).

Die nicht-osteoporotischen hMSCs geben im Mittel 220.84 (\pm 99.01) ng/10000 Zellen-Hyaluronan in den Zellkulturüberstand ab. Osteoporotische hMSCs sekretieren dagegen 560.54 (\pm 571.89) ng/10000 Zellen-Hyaluronan.

Bei der Färbung des perizellulären HA-Mantels ist kein signifikanter Unterschied in der Intensität der Fluoreszenzfärbung zu beobachten. Allerdings scheint bei den nicht-osteoporotischen hMSCs am Zellrand mehr perizelluläres HA vorhanden zu sein als bei den osteoporotischen hMSCs.

Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass sich die hMSCs von den verschiedenen Spendern zwar nicht in der exprimierten Menge, aber in der Aktivität unterscheiden. Untersuchungen des Hyaluronanmantels unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops könnten im Folgenden mehr Aufschluss geben. Es könnten auch Unterschiede in den Dicken des Hyaluronanmantels gemessen werden (Reiprich, Hofbauer et al. 2020). Interessant wäre es auch zu untersuchen, ob die hMSCs aus osteoporotischen und nicht-osteoporotischen Knochen sich in der Ausbildung von mikrovilliähnlichen Strukturen unterscheiden. Die Anzahl dieser Ausstülpungen sind ein Hinweis auf die Aktivität der Hyaluronansynthesen (Koistinen, Kärnä et al. 2015; Reiprich, Akova et al. 2021)

Die Hyaluronidasen von Säugern sind 4-Glycanohydrolasen, und das Hauptprodukt der Hyaluronidasen sind Tetrasaccharidmoleküle (Gushulak, Hemming et al. 2012).

In vitro sind die Hyaluronidasenaktivität und der tatsächliche Einfluss auf die produzierte Menge des Hyaluronans schwer nachweisbar. Es wurde beobachtet, dass die Exposition mit Hyaluronidasen zu einer schnelleren Abnahme der Hyaluronan-Viskosität führte. Die initiale HA-Hydrolyse-Rate durch Zugabe der Hyaluronidase variierte im Verlauf stark in der Kettenlänge und war abhängig von der Bildung eines stabilen Enzym-Substrat-Komplexes (Ferguson, Roberts et al. 2011).

4.5 Hyaluronaneinfluss auf adhärenente Eigenschaften sowie die Ausbreitung von immortalisierten hMSCs

Aus der Literatur ist bekannt, dass der perizelluläre Hyaluronanmantel von Chondrozyten (Petit and Thiery 2000; Geiger, Bershadsky et al. 2001), aber auch von hMSCs (Reiprich, Hofbauer et al. 2020) die frühen Adhäsionseigenschaften der Zellen fördern. Hierbei scheinen die Zellen schneller zu adhäreren, je dicker der Hyaluronanmantel ist (Evanko, Tammi et al. 2007). Die Adhäsion von A6-Zellen, Nierenepithelzellen aus *Xenopus laevis*, wird durch Hyaluronan verbessert, wenn entweder die Zelloberfläche oder das Substrat, an das die Zelle adhärert, mit Hyaluronan beschichtet war (Zimmerman, Geiger et al. 2002). Waren beide Oberflächen mit Hyaluronan beschichtet, fand hingegen keine Adhäsion statt. Demnach scheint Hyaluronan ein bedeutender Regulator der initialen Adhäsion von Zellen an eine Oberfläche zu sein.

Durch unsere Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die initiale Adhäsion von immortalisierten hMSCs, den SCP1-Zellen, durch die Modulation des perizellulären Hyaluronanmantels mittels Überexpression der Hyaluronansynthasen beeinflusst werden kann (Reiprich, Hofbauer et al. 2020). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die initiale Adhäsion sowie die Ausbreitung auch durch die Beschichtung von Zellkulturplatten beeinflusst werden kann. Obwohl hMSCs die HA-bildenden HAS exprimieren, haben die SCP1-Zellen in unseren Zellkulturbedingungen kaum perizelluläres Hyaluronan (Reiprich, Hofbauer et al. 2020) adhärert, so dass eine Förderung der frühen Adhäsion von SCP1-Zellen durch Beschichtung der Zellkulturplatten mit Hyaluronan vermutet werden kann.

Um die Adhäsionseigenschaften der Zellen zu untersuchen wurden die Kunststoff-6-Well-Platten mit Hyaluronan unterschiedlichen Molekulargewichts beschichtet. Es

wurde bereits vorgeschlagen, dass das Hyaluronan, das sich auf der Zelloberfläche befindet, bereits bei der Begegnung mit dem Substrat die Zellmatrix-Adhäsionsfunktion vermitteln und modulieren kann. Dabei geht es um stereospezifische chemische Wechselwirkungen (Zimmerman, Geiger et al. 2002).

Wie erwartet, konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung der Zellkulturplatten mit HM-HA und UNM-HA die Adhäsion beschleunigt. Durch die Beschichtung mit HM-HA sind 50 % der Zellen nach 15 min, durch die mit UNM-HA sind 50 % der Zellen nach 12,5 min adhären. Ohne Beschichtung benötigen die Zellen hingegen 17 min zur Adhäsion. Seltsamerweise verlangsamt die Beschichtung mit NM-HA die Adhäsion der SCP1-Zellen (17,5 min).

Auf die ersten Adhäsionsschritte der Zellen folgt das aktive Ausbreiten („Spreading“) der Zellen (Reiprich, Hofbauer et al. 2020). Dabei werden transmembrane Adhäsionsrezeptoren, die sogenannten Integrine, aktiviert. Anschließend verbinden sie ECM-Komponenten wie Fibronectin und Vitronectin mit dem Aktinzytoskelett über intrazelluläre Bindepartner wie Talin. Es werden Fokaladhäsionskomplexe, die Paxillin, Vinculin und Talin enthalten, ausgebildet. Diese reifen anschließend in fokalen Adhäsionsstellen und fibrillären Adhäsionen, und die Zellen können sich auf dem Substrat ausbreiten (Petit and Thiery 2000; Geiger, Bershadsky et al. 2001; Zamir and Geiger 2001, Hynes 2002). Die Zellausbreitung lässt sich dadurch erkennen, dass die Zellen ihre runde Form verlieren und abflachen (Ng, Pawijit et al. 2019). Die SCP1-Zellen wurden auf mit HA beschichteten Platten ausgesät und zu drei verschiedenen Zeitpunkten fixiert, gefärbt und mikroskopiert. Zur Kontrolle wurden die beschichteten Platten mit Hyaluronidase behandelt. Durch Messung der Fläche der gefärbten Zellen konnten die Versuchsgruppen verglichen werden. Mikroskopisch sind Unterschiede der Zellgrößen ersichtlich. Ohne Hase-Behandlung unter Einfluss von HMW-HA bilden die Zellen bereits nach 10 min Zellausläufer. Nach 20 min sind die Zellflächen der

SCP1-Zellen mit der HMW-HA-Beschichtung größer als in den anderen Versuchsgruppen. Nach 40 min sind die Zellflächen der SCP1-Zellen auf der Beschichtung mit HMW-HA so groß wie auf den unbeschichteten Zellkulturplatten. Interessanterweise ist die Zellfläche auf der Beschichtung mit LMW-HA signifikant am kleinsten. Dies würde mit der verzögerten Adhäsion auf mit LMW-HA beschichteten Zellkulturplatten übereinstimmen. In der Literatur ist beschrieben, dass sich Fokaladhäsionskomplexe auf unbehandelten Zellkulturplatten ausbilden können, wenn auch weniger als auf Kollagen-I-beschichteten Platten (Reiprich, Hofbauer et al. 2020). Eine Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen der Fokaladhäsionskomplexe, wie z. B. von Vinculin, könnte hier jedoch in Zukunft über die mikroskopisch sichtbaren Unterschiede der Adhäsion von Osteoblasten auf Oberflächen mit und ohne HA-Beschichtung Aufschluss geben.

Diese Eigenschaften könnten bei der Planung der Therapiekonzepte im Bereich der Geweberegenerierung hilfreich werden.

In vielen randomisierten kontrollierten Studien wurde festgestellt, dass Hyaluronan die Wundheilung gegenüber anderen Therapien oder Placebo signifikant verbessert. (z. B. bei Verbrennungen, venöser Insuffizienz, Diabetes etc.). Verglichen wurden auch die verschiedenen Konzentrationen von Hyaluronan im Therapieansatz: Höhere Hyaluronankonzentrationen verbesserten den Therapieerfolg. Durch den Einfluss des Hyaluronan kann die Adhärenz sowie Migration der Zellen erklärt werden (Voigt and Driver 2012).

Ein Hyaluronan-bindendes Protein mit den Eigenschaften eines Hyaluronanrezeptors ist für die Bildung der perizellulären Matrix erforderlich (Yu, Banerjee et al. 1992).

Die mikroskopisch nachgewiesenen filopodialen Membranvorsprünge werden durch die aktive Hyaluronansynthese erzeugt und bilden das Gerüst der Hyaluronanummantelungen in den Zellen. Solche Vorsprünge gibt es auch in den

Zellen mit aktiver Hyaluronansynthese *in vivo*. Diese Strukturen wurden früher mit Invasion, Adhäsion und Multidrug-Resistenz in Verbindung gebracht. Vermutlich spielt die perizelluläre Matrix eine aktive Rolle bei der Reaktion der Zellen auf die mechanische Belastung (Evanko, Tammi et al. 2007; Koistinen, Kärnä et al. 2015).

Literatur

- Baddoo, M., K. Hill, R. Wilkinson, D. Gaupp, C. Hughes, G. C. Kopen and D. G. Phinney (2003). "Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection." *J Cell Biochem* 89(6): 1235–1249.
- Bastow, E. R., S. Byers, S. B. Golub, C. E. Clarkin, A. A. Pitsillides and A. J. Fosang (2008). "Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone." *Cell Mol Life Sci* 65(3): 395–413.
- Benisch, P., T. Schilling, L. Klein-Hitpass, S. P. Frey, L. Seefried, N. Raaijmakers, M. Krug, M. Regensburger, S. Zeck, T. Schinke, M. Amling, R. Ebert and F. Jakob (2012). "The transcriptional profile of mesenchymal stem cell populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors." *PLoS One* 7(9): e45142.
- Borah, B., T. Dufresne, J. Nurre, R. Phipps, P. Chmielewski, L. Wagner, M. Lundy, M. Bouxsein, R. Zebaze and E. Seeman (2010). "Risedronate reduces intracortical porosity in women with osteoporosis." *J Bone Miner Res* 25(1): 41–47.
- Boregowda, S. V., V. Krishnappa, J. W. Chambers, P. V. Lograsso, W. T. Lai, L. A. Ortiz and D. G. Phinney (2012). "Atmospheric oxygen inhibits growth and differentiation of marrow-derived mouse mesenchymal stem cells via a p53-dependent mechanism: implications for long-term culture expansion." *Stem Cells* 30(5): 975–987.
- Calabro, A., M. M. Oken, V. C. Hascall and A. M. Masellis (2002). "Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients." *Blood* 100(7): 2578–2585.
- Caplan, A. I. (2017). "Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!" *Stem Cells Transl Med* 6(6): 1445-1451.

- Caroti, C. M., H. Ahn, H. F. Salazar, G. Joseph, S. B. Sankar, N. J. Willett, L. B. Wood, W. R. Taylor and A. N. Lyle (2017). "A Novel Technique for Accelerated Culture of Murine Mesenchymal Stem Cells that Allows for Sustained Multipotency." *Sci Rep* 7(1): 13334.
- Chun, K. J. (2011). "Bone densitometry." *Semin Nucl Med* 41(3): 220–228.
- Coulson-Thomas, Y. M., V. J. Coulson-Thomas, A. L. Norton, T. F. Gesteira, R. P. Cavalheiro, M. C. Meneghetti, J. R. Martins, R. A. Dixon and H. B. Nader (2015). "The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth." *PLoS One* 10(6): e0131105.
- Cowman, M. K. and S. Matsuoka (2005). "Experimental approaches to hyaluronan structure." *Carbohydr Res* 340(5): 791–809.
- da Silva Meirelles, L., P. C. Chagastelles and N. B. Nardi (2006). "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues." *J Cell Sci* 119(Pt 11): 2204–2213.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8(4): 31–317.
- Ellis, S. L., J. Grassinger, A. Jones, J. Borg, T. Camenisch, D. Haylock, I. Bertoncello and S. K. Nilsson (2011). "The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature." *Blood* 118(6): 1516–1524.
- Eslaminejad, M. B., S. Nadri and R. H. Hosseini (2007). "Expression of Thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cells cultivation period." *Dev Growth Differ* 49(4): 351–364.
- Evanko, S. P., M. I. Tammi, R. H. Tammi and T. N. Wight (2007). "Hyaluronan-dependent pericellular matrix." *Adv Drug Deliv Rev* 59(13): 1351–1365.

- Evanko, S. P., M. I. Tammi, R. H. Tammi and T. N. Wight (2007). "Hyaluronan-dependent pericellular matrix." *Advanced drug delivery reviews* 59(13): 1351–1365.
- Fábián, Z., S. Ramadurai, G. Shaw, H. P. Nasheuer, W. Kolch, C. Taylor and F. Barry (2014). "Basic fibroblast growth factor modifies the hypoxic response of human bone marrow stromal cells by ERK-mediated enhancement of HIF-1 α activity." *Stem Cell Res* 12(3): 646–658.
- Fedarko, N. S., U. K. Vetter, S. Weinstein and P. G. Robey (1992). "Age-related changes in hyaluronan, proteoglycan, collagen, and osteonectin synthesis by human bone cells." *J Cell Physiol* 151(2): 215–227.
- Ferguson, E. L., J. L. Roberts, R. Moseley, P. C. Griffiths and D. W. Thomas (2011). "Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments." *Int J Pharm* 420(1): 84–92.
- Florencio-Silva, R., G. R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões and P. S. Cerri (2015). "Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells." *Biomed Res Int* 2015: 421746.
- Fraser, J. R., T. C. Laurent and U. B. Laurent (1997). "Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover." *J Intern Med* 242(1): 27–33.
- Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II and K. V. Petrakova (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." *J Embryol Exp Morphol* 16(3): 381–390.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov and K. M. Yamada (2001). "Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(11): 793–805.
- Genant, H. K., K. G. Faulkner, C. C. Gluer and K. Engelke (1993). "Bone densitometry: current assessment." *Osteoporos Int* 3 Suppl 1: 91–97.

- Gosch, M., U. Stumpf, C. Kammerlander, W. Böcker, H. J. Heppner and S. Wicklein (2018). "[Management of osteoporosis after fragility fractures]." *Z Gerontol Geriatr* 51(1): 113–125.
- Grabowski, P. (2009). "Physiology of bone." *Endocr Dev* 16: 32–48.
- Gushulak, L., R. Hemming, D. Martin, V. Seyrantepe, A. Pshezhetsky and B. Triggs-Raine (2012). "Hyaluronidase 1 and β -hexosaminidase have redundant functions in hyaluronan and chondroitin sulfate degradation." *J Biol Chem* 287(20): 16689–16697.
- Haasters, F., W. C. Prall, I. Westphal, W. Böcker, D. Padula, W. Mutschler, D. Docheva and M. Schieker (2013). "Overexpression of dnIKK in mesenchymal stem cells leads to increased migration and decreased invasion upon TNF α stimulation." *Biochem Biophys Res Commun* 436(2): 265–270.
- Hachisuka, H., Y. Mochizuki, Y. Yasunaga, K. Natsu, P. Sharman, R. Shinomiya and M. Ochi (2007). "Flow cytometric discrimination of mesenchymal progenitor cells from bone marrow-adherent cell populations using CD34/44/45(-) and Sca-1(+) markers." *J Orthop Sci* 12(2): 161–169.
- Hadjidakis, D. J. and Androulakis, II (2006). "Bone remodeling." *Ann N Y Acad Sci* 1092: 385–396.
- Hammond, I. and D. J. Lyons (2020). "Bone Mineral Densitometry Reporting and the CAR Technical Standards: Tips for the Radiologist." *Can Assoc Radiol J* 71(2): 134–135.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz and M. K. Brenner (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." *Nat Med* 5(3): 309–313.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* 110(6): 673–687.

- Itano, N. and K. Kimata (2002). "Mammalian hyaluronan synthases." *IUBMB Life* 54(4): 195–199.
- Kanis, J. A., E. V. McCloskey, H. Johansson, C. Cooper, R. Rizzoli and J. Y. Reginster (2013). "European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women." *Osteoporos Int* 24(1): 23–57.
- Katsimbri, P. (2017). "The biology of normal bone remodelling." *Eur J Cancer Care (Engl)* 26(6).
- Koistinen, V., R. Kärnä, A. Koistinen, A. Arjonen, M. Tammi and K. Rilla (2015). "Cell protrusions induced by hyaluronan synthase 3 (HAS3) resemble mesothelial microvilli and share cytoskeletal features of filopodia." *Exp Cell Res* 337(2): 179–191.
- Kolf, C. M., E. Cho and R. S. Tuan (2007). "Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation." *Arthritis Res Ther* 9(1): 204.
- Lee, J. Y. and A. P. Spicer (2000). "Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule." *Curr Opin Cell Biol* 12(5): 581–586.
- Lerner, U. H. (2006). "Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis." *J Dent Res* 85(7): 584–595.
- Li, H., R. Ghazanfari, D. Zacharaki, H. C. Lim and S. Scheduling (2016). "Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells." *Ann N Y Acad Sci* 1370(1): 109–118.
- Liang, J., D. Jiang and P. W. Noble (2016). "Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases." *Adv Drug Deliv Rev* 97: 186–203.
- Lv, F. J., R. S. Tuan, K. M. Cheung and V. Y. Leung (2014). "Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* 32(6): 1408–1419.

- Mania, V. M., A. G. Kallivokas, C. Malavaki, A. P. Asimakopoulou, J. Kanakis, A. D. Theocharis, G. Klironomos, G. Gatzounis, A. Mouzaki, E. Panagiotopoulos and N. K. Karamanos (2009). "A comparative biochemical analysis of glycosaminoglycans and proteoglycans in human orthotopic and heterotopic bone." *IUBMB Life* 61(4): 447–452.
- Ng, I. C., P. Pawijit, J. Tan and H. Yu (2019). *Anatomy and Physiology for Biomaterials Research and Development*. Encyclopedia of Biomedical Engineering. R. Narayan. Oxford, Elsevier: 225–236.
- Nijenhuis, T., J. G. Hoenderop and R. J. Bindels (2005). "TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate." *Pflugers Arch* 451(1): 181–192.
- Nilsson, S. K., D. N. Haylock, H. M. Johnston, T. Occhiodoro, T. J. Brown and P. J. Simmons (2003). "Hyaluronan is synthesized by primitive hemopoietic cells, participates in their lodgment at the endosteum following transplantation, and is involved in the regulation of their proliferation and differentiation in vitro." *Blood* 101(3): 856–862.
- Oohira, A. and H. Nogami (1989). "Elevated accumulation of hyaluronate in the tubular bones of osteogenesis imperfecta." *Bone* 10(6): 409–413.
- Owen, M. and A. J. Friedenstein (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors." *Ciba Found Symp* 136: 42–60.
- Park, J. Y., H. J. Jeon, T. Y. Kim, K. Y. Lee, K. Park, E. S. Lee, J. M. Choi, C. G. Park and S. H. Jeon (2013). "Comparative analysis of mesenchymal stem cell surface marker expression for human dental mesenchymal stem cells." *Regen Med* 8(4): 453-466.
- Petit, V. and J. P. Thiery (2000). "Focal adhesions: structure and dynamics." *Biol Cell* 92(7): 477–494.
- Phinney, D. G., G. Kopen, R. L. Isaacson and D. J. Prockop (1999). "Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation." *J Cell Biochem* 72(4): 570–585.

- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143–147.
- Pittenger, M. F., J. D. Mosca and K. R. McIntosh (2000). "Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma." *Curr Top Microbiol Immunol* 251: 3–11.
- Puissant, E. and M. Boonen (2016). "Monocytes/Macrophages Upregulate the Hyaluronidase HYAL1 and Adapt Its Subcellular Trafficking to Promote Extracellular Residency upon Differentiation into Osteoclasts." *PLoS One* 11(10): e0165004.
- Puk, O., X. Yan, S. Sabrautzki, H. Fuchs, V. Gailus-Durner, M. Hrabě de Angelis and J. Graw (2013). "Novel small-eye allele in paired box gene 6 (Pax6) is caused by a point mutation in intron 7 and creates a new exon." *Mol Vis* 19: 877–884.
- Qu, C., K. Rilla, R. Tammi, M. Tammi, H. Kröger and M. J. Lammi (2014). "Extensive CD44-dependent hyaluronan coats on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced by hyaluronan synthases HAS1, HAS2 and HAS3." *Int J Biochem Cell Biol* 48: 45–54.
- Raggatt, L. J. and N. C. Partridge (2010). "Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling." *J Biol Chem* 285(33): 25103–25108.
- Reed, R. K., K. Lilja and T. C. Laurent (1988). "Hyaluronan in the rat with special reference to the skin." *Acta Physiol Scand* 134(3): 405–411.
- Reiprich, S., E. Akova, A. Aszódi and V. Schönitzer (2021). "Hyaluronan Synthases' Expression and Activity Are Induced by Fluid Shear Stress in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Int J Mol Sci* 22(6).
- Reiprich, S., E. Hofbauer, S. Kiderlen, H. Clausen-Schaumann, W. Böcker, A. Aszódi and V. Schönitzer (2020). "Adhesive Properties of the Hyaluronan Pericellular Coat in

- Hyaluronan Synthases Overexpressing Mesenchymal Stem Cells." *Int J Mol Sci* 21(11).
- Rilla, K., R. Tiihonen, A. Kultti, M. Tammi and R. Tammi (2008). "Pericellular hyaluronan coat visualized in live cells with a fluorescent probe is scaffolded by plasma membrane protrusions." *J Histochem Cytochem* 56(10): 901–910.
- Rosca, A. M. and A. Burlacu (2010). "Isolation of a mouse bone marrow population enriched in stem and progenitor cells by centrifugation on a Percoll gradient." *Biotechnol Appl Biochem* 55(4): 199–208.
- Singer, N. G. and A. I. Caplan (2011). "Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation." *Annu Rev Pathol* 6: 457–478.
- Siris, E. S., R. Adler, J. Bilezikian, M. Bolognese, B. Dawson-Hughes, M. J. Favus, S. T. Harris, S. M. Jan de Beur, S. Khosla, N. E. Lane, R. Lindsay, A. D. Nana, E. S. Orwoll, K. Saag, S. Silverman and N. B. Watts (2014). "The clinical diagnosis of osteoporosis: a position statement from the National Bone Health Alliance Working Group." *Osteoporos Int* 25(5): 1439-1443.
- Soleimani, M. and S. Nadri (2009). "A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow." *Nat Protoc* 4(1): 102–106.
- Stumpf, U., E. Hesse, W. Böcker, C. Kammerlander, C. Neuerburg and R. Schmidmaier (2019). "[Differential diagnoses of osteoporosis]." *Z Gerontol Geriatr* 52(5): 414-420.
- Truscott, J. G., J. Devlin and P. Emery (1996). "DXA scanning." *Baillieres Clin Rheumatol* 10(4): 679–698.
- Voigt, J. and V. R. Driver (2012). "Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." *Wound Repair Regen* 20(3): 317–331.
- Wahner, H. (1989). Defining osteoporosis.

- Xu, S., A. De Becker, B. Van Camp, K. Vanderkerken and I. Van Riet (2010). "An improved harvest and in vitro expansion protocol for murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *J Biomed Biotechnol* 2010: 105940.
- Yew, T. L., M. C. Chang, Y. T. Hsu, F. Y. He, W. H. Weng, C. C. Tsai, F. Y. Chiu and S. C. Hung (2013). "Efficient expansion of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow under hypoxic conditions." *J Tissue Eng Regen Med* 7(12): 984–993.
- Yu, Q., S. D. Banerjee and B. P. Toole (1992). "The role of hyaluronan-binding protein in assembly of pericellular matrices." *Dev Dyn* 193(2): 145–151.
- Zamir, E. and B. Geiger (2001). "Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions." *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3583–3590.
- Zheng, B., B. Cao, G. Li and J. Huard (2006). "Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo." *Tissue Eng* 12(7): 1891–1901.
- Zhu, H., Z. K. Guo, X. X. Jiang, H. Li, X. Y. Wang, H. Y. Yao, Y. Zhang and N. Mao (2010). "A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone." *Nat Protoc* 5(3): 550–560.
- Zimmerman, E., B. Geiger and L. Addadi (2002). "Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan." *Biophys J* 82(4): 1848–1857.
- Zimmerman, E., B. Geiger and L. Addadi (2002). "Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan." *Biophysical journal* 82(4): 1848–1857.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein Dank gilt hierbei in gleichem Maße:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schieker, für die Vergabe dieses interessanten Themas.

Insbesondere Frau Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer, für die hervorragende Betreuung sowie für die fachliche und menschliche Unterstützung während des Projektes.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker, Direktor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie für die Unterstützung bei Zur-Verfügung-Stellung der Spenderknochen sowie Mentoring.

Frau Prof. Dr. Susanne Mayer für die Mitbetreuung.

Das FöFoLe Programm für die Möglichkeit der Absolvierung des strukturierten Promotionsprogramms sowie Zu-Verfügung-Stellen finanziellen Mittel.

Herrn PD Dr. Attila Aszodi, Leiter des ExperiMed Labors, für das Zur-Verfügung-Stellen der technischen Ausstattung sowie fachliche Unterstützung.

Herrn Dr. rer. nat. Maximilian Saller und Dr. rer. biol. hum. Paolo Alberton für die Unterstützung der Etablierung und beim Erlernen der Methoden sowie Begleitung in der Arbeit mit den Tieren.

Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Reiprich für die tägliche Betreuung und Unterstützung bei Erlernen von den Methoden.

Bei dem gesamten ExperiMed-Team, insbesondere Heidrun Grondinger, Zsuzsanna Farkas, Martina Burggraf für die fachliche Unterstützung sowie positive Arbeitsatmosphäre. Meiner Familie, meinen Freunden sowie Kollegen für ihre Unterstützung.

Affidavit

Eidesstattliche Versicherung

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

Untersuchung der Funktion von Hyaluronan und Hyaluronansynthasen im Knochen eines Mausmodells für „Osteogenesis Imperfecta“ und im Knochen von osteoporotischen Patienten

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.

Freiburg, den 14.06.2023

Anastasiya Kornyeva

