

Aus dem Anatomischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. J. Sievers)  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Haben programmable cells of monocytic  
origin (PCMOs) als Stammzellen des peripheren Blutes das  
Potential, durch  
Stimulation mit bone morphogenetic protein (BMP)-7 und -2 zu  
Kollagen Typ II produzierenden Chondrozyten differenziert zu  
werden?

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
vorgelegt von:

Stefanie Engels (geb. Dressel)  
aus Düsseldorf  
Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Pufe, Insitut für Anatomie und Zellbiologie  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Fändrich, Klinik für Angewandte Zelltherapie  
Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2010  
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 19.10.2010  
gez.: Prof. Dr. Mentlein, Insitut für Anatomie und Zellbiologie  
PD Dr. Böttner, Insitut für Anatomie und Zellbiologie

**Veröffentlichung dieser Arbeit:**

Pufe T, Petersen W, Fändrich F, Varoga D, Wruck C J, Mentlein R, Helfenstein A, Hoseas D, Dressel S, Tillmann B, Ruhnke M  
*Programmable cells of monocytic origin (PCMO): A source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes* (2008) *Journal of orthopaedic research* 26(3):304-313 (Impact Faktor: 2,963)

## Verzeichnis der Abkürzungen

### A

Abb.	Abbildung
ACT	Chondrozytentransplantation
APAAP	Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase

### B

BMP	Bone Morphogenetic Protein
BP	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin

### C

°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD 14+	Cluster of Differentiation
COX-2	Cyclooxygenase 2

### D

DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
DNA	Desoxyribonukleinacid
DNase	Desoxyribonukleinacid spaltendes Enzym

### E

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESC	Embryonale Stammzelle
et al.	et altera
etc.	et cetera

### F

FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
-----	--

### G

G	Gravitationskraft (x 9,8 m/sec <sup>2</sup> )
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GIT	Guanidinium-Isothiocyanat

### H

HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

### I

IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-3	Interleukin 3

### K

kDa	Kilo Dalton
-----	-------------

### M

M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
M	Molar
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinacid
MSC	mesenchymal stem cell (Mesenchymale Stammzelle)

### N

nl	Nanoliter
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
<b>O</b>	
Operation	OP
OA	Osteoarthrose
<b>P</b>	
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline (Waschpuffer)
PCMO	Programmable cell of monocytic origin
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Primer	Starter-DNA, Bezeichnung für kurze einzelsträngige DNA oder RNA-Sequenzen, die bei der DNASynthese Startermoleküle darstellen
<b>R</b>	
RNA	Ribonukleotidacid
RNase	Ribonuklein Säure spaltendes Enzym
rpm	rounds per minutes
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (Nährmedium)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
rtRT-PCR	real time reverse transcriptase polymerase chain reaction
<b>S</b>	
sec.	Sekunden
sog.	sogenannt
<b>T</b>	
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris Buffered Saline
TGF-β1	Transforming growth factor-β1
<b>U</b>	
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
<b>V</b>	
VEGF	Vascular endothelial growth factor
<b>Z</b>	
z.B.	zum Beispiel

# INHALTSVERZEICHNIS

## 1. Einleitung

- 1.1 Thematische Einführung
- 1.2 Gelenkknorpel: Aufbau, Stoffwechsel, Architektur
- 1.3 Arthrose
- 1.4 Zellpopulation und Wachstumsfaktoren

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

- 2.1.1 Isolation der Zellen
- 2.1.2 Adhärenz der Zellen
- 2.1.3 Kultivierung/Differenzierung der Zellen
- 2.1.4 Umsetzung in 6 Well Mehrfachkulturschalen
- 2.1.5 Versorgung der Zellen
- 2.1.6 Abbruch der Kultivierung

### 2.2 Immunhistochemische Methoden

- 2.2.1 Kollagen Typ I und II Färbung
- 2.2.2 CD 14 Färbung
- 2.2.3 Elektronenmikroskopie

### 2.3 Molekularbiologische Methoden

- 2.3.1 RNA Isolierung
- 2.3.2 PCR (Polymerasekettenreaktion)
  - 2.3.2.1 Ein Schritt RT-PCR
  - 2.3.2.2 Echtzeit RT-PCR

### 2.3.3 Sandwich ELISA

2.3.3.1 Prinzip des ELISA

2.3.3.2 Vorbereitung der Mikrotiterplatte

2.3.3.3 Probenvorbereitung

2.3.3.4 Protokoll für die Durchführung

2.3.3.5 Auswertung der Messung

### 2.4 Statistik

## 3. Ergebnisse

### 3.1

Nachweis der Produktion von Kollagen Typ I und Typ II im Rahmen einer immunhistochemischen Färbung

### 3.2

Darstellung der morphologischen Veränderung von PCMOs unter Stimulation mit BMP-7 und BMP-2, mittels Elektronenmikroskopie

### 3.3

Quantitativer Nachweis der Kollagen Typ II Produktion im Restmedium der PCMOs durch ELISA

### 3.4

Nachweis von Kollagen Typ I und II mRNA mittels RT-PCR nach Stimulation der PCMOs mit BMP-2 und BMP-7

### 3.5

Qualitativer Nachweis der mRNA von Kollagen Typ I und II in PCMOs durch real time RT-PCR nach Stimulation mit BMP2 und BMP7

## 4. Diskussion

## 5. Zusammenfassung

## 6. Literaturverzeichnis

## 7. Danksagung

## 8. Curriculum vitae

# 1 Einleitung

## 1.1. Thematische Einführung

In der heutigen Zeit werden die Menschen besonders in den Industrienationen immer älter. Dies haben wir nicht nur den besseren Hygiene - und Ernährungsstandards zu verdanken, sondern auch, in besonderem Maße den Errungenschaften der medizinischen Forschung. Die demographische Verschiebung stellt die Medizin jedoch vor neue Herausforderung, da das Älterwerden oft nicht nur mit dem Gewinn von Lebenszeit verbunden ist, sondern auch mit dem Erwerb zahlreicher altersbedingter Erkrankungen. Eine dieser Erkrankungen multifaktorieller Genese ist die Degeneration des Gelenkknorpels, die Arthrose. Durch die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit der Chondrozyten ist Arthrose zurzeit zwar behandel- aber nicht heilbar (Buckwalter et al. 1997). Um das 40. Lebensjahr sind heute, bei der Hälfte unserer Bevölkerung degenerative Verschleißerscheinungen des Gelenkknorpels in Röntgenuntersuchungen sichtbar. Auch wenn nur ein viertel dieser Patienten über subjektive Beschwerden klagt, handelt es sich um eine beeindruckende Zahl von ca. 5 Millionen Patienten mit symptomatischer Arthrose, allein in Deutschland (Niethard und Pfeil 2003)

Arthrose kann als Volkserkrankung der Gelenke bezeichnet werden. Sie zeichnet sich durch ihre enorme Schmerzhaftigkeit mit starker Beeinträchtigung der Lebensqualität für die Betroffenen aus.

Die Ursachen der Erkrankung sind vielfältig. Zahlreiche Mechanismen können zu einer Schädigung des Gelenkknorpels führen, wie z.B. primäre und sekundäre Veränderungen des Gelenkknorpels durch Achsenfehlstellungen, Traumata, altersbedingte Regression, Infektionen oder auch Autoimmunerkrankungen (Heuselmann 1998).

Die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des hyalinen Gelenkknorpels resultiert aus der nicht vorhandenen nervalen, lymphatischen und vaskulären Versorgung, sowie entscheidend, aus der nicht vorhandenen Stammzellschicht des Perichondriums. Darüber hinaus verliert der Knorpel nach Beendigung der Wachstumsphase seine mitotische Aktivität.

Im Falle eines rein chondralen Defektes ist die ohnehin limitierte Regeneration des Knorpels im Besondern Maße eingeschränkt. Es kommt, im Gegensatz zum osteochondralen Defekt, durch fehlende Gefäß- und Knocheneröffnung nicht zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Einwanderung pulripotenter Bindegewebszellen. (Shortkroff et al. 1996). Bei osteochondralen Defekten kann dagegen defekter hyaliner Knorpel durch Faserknorpel ersetzt werden. Dieser ist allerdings, durch den hohen Kollagen Typ I Gehalt, mechanisch weniger belastbar und auf lange Sicht kein adäquater Ersatz für hyalinen Knorpel (Caplan et al.1997).

Der Pathomechanismus einer Arthrose gleicht daher sehr einem Circulus vitiosus. Ausgangspunkt hierbei ist immer der Knorpeldefekt. Da dieser nicht regeneriert werden kann und es zu einer verstärkten Belastung des umliegenden Gewebes kommt, sind noch größere Defekte und verstärkte Symptomatik die Folge.

Bis heute gibt es keine zufriedenstellende Therapie für die Arthrose. Die Mittel der Wahl sind Schmerzmittel, Bewegungs- und Muskelaufbautherapien oder, im schlimmsten Fall der Gelenkersatz. Arthrose wird also symptomatisch behandelt oder prophylaktisch, aber nie kurativ.

Insbesondere der endprothetische Gelenkersatz birgt das Risiko von Komplikationen, wie z.B. Prothesenlockerung und Infektionen und weißt nur begrenzte Haltbarkeit auf, die häufig mit erneuten Operationen verbunden ist. Dies sind insbesondere für jüngere Patienten, die ggf. im Laufe ihres Lebens 3-4mal einen erneuten Gelenkersatz benötigen Risiken, die Mangels Alternativen in Kauf genommen werden müssen. (Knutsen et al, 1986)

Aus diesen Gründen rücken schon seit Jahren alternative Verfahren zur Behandlung der Arthrose immer mehr ins Zentrum der medizinischen Forschung. Ein neues Verfahren ist das Tissue Engineering. Hierbei werden aus autologen Zellen, Gewebe und Gewebe-Ersatzsysteme kultiviert und entwickelt, die eine besser Verträglichkeit und fehlende Fremdkörperreaktionen versprechen. Mit diesem Verfahren kann das transplantierte Gewebe individuell an den Patienten und die gegebene Pathologie angepasst werden.

Die bisher häufig für Tissue Engineering verwendeten mesenchymalen Stammzellen (MSC) des Knochenmarkes sind nur schwierig und schmerzhaft zu gewinnen. Sie weisen im Hinblick auf die entstandene Knorpelqualität noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse auf. (Mackay et al. 1998)

Inhalt dieser Arbeit war daher der Versuch, einfach zugängliche und fast unbegrenzt verfügbare monozytäre Stammzellen des peripheren Blutes durch Kultivierung mit bone morphogenetic protein-2 und -7 zu Kollagen Typ II produzierenden Zellen zu transformieren.

## **1.2. Gelenkknorpel: Aufbau, Stoffwechsel, Architektur**

Hyaliner Gelenkknorpel ist die häufigste Knorpelart des Menschen und zählt zu den Binde- und Stützgeweben. Sein Ursprung ist mesenchymal. Nach Abschluss der Wachstumsphase bleibt hyaliner Knorpel im Bereich der Trachea, der Bronchien, des ventralen Rippenfortsatzes und an den Gelenkflächen erhalten. Im Bereich der Gelenkflächen ermöglicht hyaliner Knorpel zusammen mit der Synovia die reibungsarme Artikulation und damit die problemlose Bewegung. Die Versorgung des gefäßfreien Knorpels findet ausschließlich durch Diffusion und Konvektion über die Synovialflüssigkeit statt (Schünke 2000).

Innerhalb des Gelenkknorpels werden auf Grund der strukturellen und morphologischen Unterschiede vier Zonen histologisch unterschieden. Die Tangentialzone bildet die sehr dünne (100µm), oberflächliche Schicht, in der die Chondrozytenlängachse parallel zur Oberfläche ausgerichtet ist. Die Kollagenfibrillen ziehen von hier bogenförmig nach unten. In der Tangentialzone ist die Wasserbindungskapazität der Knorpelgrundsubstanz am größten, die sich zu etwa 60-70% aus Wasser und zu 30-40% aus Glycanen, Kollagenen, Glycoproteinen, Lipiden und Mineralien zusammensetzt. Das Wasser im hyalinen Knorpel wird durch Proteoglycane gebunden. Das Hauptproteoglycan des hyalinen Knorpels ist das Aggrecan, das aufgrund hoher negativer Ladungsdichte der Sulfat- und Carboxylatgruppen, sowie der Glycosaminoglycanketten, eine enorme Speicherkapazität des dipolaren Wassermoleküls besitzt. Durch die Polarität der Moleküle entsteht im Knorpelgewebe selber eine Spannung (Innendruck), da sich die negativ geladenen Ketten voneinander abstoßen (Junqueira, Carnerio, Schiebler 1996). Im Zusammenspiel mit den im Knorpelgewebe netzartig gebogen und verspannten Kollagenfasern, ist hyaliner Knorpel daher in der Lage elastisch und verformbar zu bleiben und sehr widerstandsfähig Druck und Scherkräften gegenüber. Die zweite Zone bildet die so genannte Übergangszone, in ihr verlaufen die Kollagenfibrillen bogenförmig gekreuzt. Direkt daran schließt sich die Radiärzone an,

die breiteste Schicht des Gelenkknorpels. In ihr verlaufen die Kollagenfasern senkrecht zur Oberfläche und haben ihren größten Durchmesser. Die hier bei ca. 5% der Zellen vorhandene, hochspezifische Zellmorphologie weist auf eine ausgeprägte Synthese von Extrazellulärmatrix hin (Narmoneva et al. 2001). Im hyalinen Knorpel findet sich hauptsächlich Kollagen Typ II, es kommt aber auch Kollagen Typ I, IV, IX und XI vor (Buckwalter 1998). Kollagen Typ IX und XI spielen eine wichtige Rolle für die Quervernetzung von Kollagen Typ II und somit für die Stabilität des Kollagengerüsts.

Die Radiärzone wird von der Mineralisationszone scharf durch eine dünne (2-5µm) Schicht abgegrenzt, der sogenannten tide mark. Die Mineralisationszone könnte auch als Verbindungszone mit dem subchondralen Knochen bezeichnet werden. In ihr lagern sich Kalziumkristalle in die Chondrozyten ein. Hier findet die Druck- und Schubübertragung von Knorpel auf Knochen statt. Die auf den Knorpel wirkenden Kräfte stellen den Erhaltungsreiz für den Knorpel da. Dieser Reiz fehlt z.B. bei Immobilisation, durch die es zu einer Ossifikation des chondralen Gewebes kommen kann (Schünke 2000). Den pathogenetisch relevanten Faktor für die Zerstörung des Knorpels durch Immobilisation, ist die durch den fehlenden Druck, ausbleibende Diffusion von Nährstoffen. Dies gilt besonders für die tieferen Schichten des Knorpels, in denen Ossifikation auf diese Weise gefördert wird.

### **1.3. Arthrose**

Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung überhaupt. Ihre Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter, wobei der Grundsatz gilt: Nach dem 65. Lebensjahr gibt es quasi keinen Menschen mehr ohne degenerative Veränderungen der Gelenke. Arthrose ist definiert als eine chronisch progrediente, degenerative, primär nicht entzündliche Erkrankung des Knorpels, mit multifaktorieller Genese. Die häufigsten Symptome sind Schwellung, Schmerzen, Bewegungseinschränkung der Gelenke und Deformation, durch Exophyten- und Osteophytenbildung des gelenknahen Knochens. Die am häufigsten betroffenen Gelenke sind die der Wirbelsäule, erst dahinter kommen Knie, Hüfte und Schulter. Ursache der Arthrose ist immer ein Missverhältnis zwischen Belastung und Belastungsfähigkeit des betroffenen Gelenkes. Bei primären Arthrosen ist die Ursache weitgehend unklar, sie treten jedoch häufig bei Frauen auf und weisen eine genetische Komponente auf (Cicutini

et al. 1996). Sekundären Arthrosen entstehen bei Knorpelschädigung durch Traumata, Fehlstellungen oder Entzündungen. Hierbei ist es therapeutisch wichtig, die rein mechanischen Ursachen von anderen zu unterscheiden, da diese oftmals durch Hilfsmittel ausgeglichen werden können und so ein Fortschreiten der Erkrankung einfach verhindert werden kann (Niethard, Pfeil 2003).

Im Verlauf der Arthrose wird zwischen Früh-, Spät- und Endstadium unterschieden. Das Frühstadium zeichnet sich durch erste Demaskierung von Kollagenfasern, bedingt durch beginnende Knorpelschädigung aus, auf deren Boden es zu ersten entzündlichen Veränderungen kommt. Diese führen zu belastungsabhängigen Schmerzen. Im Spätstadium kommt es auf dem Boden von Höhenabnahme des Gelenkknorpels zur chondralen Spaltbildung, Auffaserung und subchondralen Sklerosierung. Es folgt der Funktionsverlust des Knorpels, durch den es nicht mehr möglich ist Schub- und Scherkräfte auszugleichen. Dies führt unweigerlich zur Deformierung des Gelenkes, welche im Endstadium der Arthrose auftritt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Knorpel des Gelenks fast vollständig abgerieben, man spricht von der sogenannten Knochenglatze und es kommt zur Osteophyten- und Zystenbildung (Pullig et al. 2001). Die degenerativen Veränderungen der Arthrose sind nicht reversibel und werden von den Patienten oft erst wahrgenommen, wenn es zu belastungsabhängigen Schmerzen oder Verspannungen kommt. Verspannungen entstehen vorwiegend durch Schonhaltung und können auch in anderen Regionen des Körpers manifest werden. Die Gefahr für eine Fehldiagnose liegt genau hier, da die eigentliche Ursache für die Verspannungen häufig übersehen wird und in Folge dessen auch keine adäquate Behandlung der Arthrose im Frühstadium stattfindet (Niethard, Pfeil 2003).

Die oben aufgeführte Stadien-Einteilung erfolgt auf dem Boden der radiologischen Merkmale der Gelenkveränderung, es gibt jedoch noch weitere klinische Diagnosekriterien. Hierzu zählen neben den radiologischen Veränderungen, Schmerz, Schwellung und eingeschränkte Funktionalität des Gelenkes (Bellamy et al. 1997). Bisher gibt es keine zufriedenstellende Therapie für die Arthrose, die meisten Ansätze sind eher symptomatisch als kurativ orientiert. Die Mittel der Wahl sind heute der Einsatz von analgetischen und antiinflammatorischen Medikamenten, sowie die Anwendung mechanisch, funktioneller Bewegungs- und Muskelaufbautherapien. Ultima ratio ist auch heute noch der Gelenkersatz durch

Prothesen. Die Anzahl von allein 340.000 Operationen pro Jahr in Deutschland (Quarzt 2010), verdeutlicht wie viele Menschen von Arthrose betroffen sind.

Das Ziel medizinischer Forschung auf diesem Gebiet ist zurzeit, die Entwicklung einer nicht nur Verlauf verzögernden Therapie, sondern einer Therapie, die das Fortschreiten der Erkrankung verhindert. Diese Therapie müsste im Stadium I der Erkrankung ansetzen und den Abbau des Knorpels aufzuhalten. Mit diesem Ansatz beschäftigt sich diese Doktorarbeit.

Adulten hyaliner Knorpel hat auf Grund seiner Avaskularität, dem Fehlen des Perichondriums und von Stammzellen, nur ein sehr eingeschränktes Potential zur Regeneration. Bisher hat man viele Ansätze verfolgt und neue Techniken entwickelt, um zerstörtes Knorpelgewebe der Gelenke wieder zu regenerieren. Unter anderem wurde versucht, die zelleigenen Mechanismen der Chondrozyten oder mesenchymaler Stammzellen auszunutzen, um ihre Regenerationsfähigkeit zu stimulieren. Doch alle bisher entwickelten Methoden waren in ihren Ergebnissen nicht zufriedenstellend. Es gab viele ungelöste Probleme, wie z.B. die schlechte Rate der erfolgreich durchgeführten Transplantationen von Chondrozyten und der fehlenden Regeneration des subchondralen Knochens im Verlauf.

Die neuste und bisher überzeugendste aber immer noch nicht zufriedenstellende Methode bildet die Transplantation von adulten mesenchymalen Stammzellen (MSC), da hierbei sowohl der Knorpel regeneriert als auch der subchondrale Knochen wieder aufgebaut wird (Pittenger et al. 1999)

## **1.4 Die Zellpopulation und Wachstumsfaktoren**

Diese Studie basiert auf einer neuen adulten, pluripotenten, monozytären Zelle, die aus peripherem, menschlichen, venösen Blut gewonnen wird und deren Potential mit dem der MSC vergleichbar ist. Genannt wird diese Zelle „programmable cell of monocytic origin“ kurz PCMO.

Die Plastizität dieser Zelle entsteht durch eine sechstägige Dedifferenzierung, die durch Inkubation im Brutschrank mit Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktor (M-CSF) und Interleukin 3 induziert wird. Es konnte gezeigt werden, dass sich PCMOs nach dieser Behandlung sowohl in Nerven-, Pankreasinsel-, Leber- aber auch Fettzellen differenzieren können (Ruhnke et.al 2005). PCMOs sind in der Lage sich

nach Dedifferenzierung zu Zellen zu entwickeln, deren Ursprung in drei verschiedenen embryonalen Keimblättern liegt.

In dieser Studie sollte das Potential von PCMOs für die Differenzierung zu Knorpelzellen untersucht werden. Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Studie, in der folgende Wachstumsfaktoren zur Stimulation herangezogen wurden: Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und der transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ 1). Bone morphogenetic proteins (BMPs) wurden ursprünglich 1965 durch ihre Fähigkeit, ektopische Knorpel- und Knochenbildung in vivo zu induzieren identifiziert (Urist 1965). Heute sind mehr als 20 Mitglieder dieser Gruppe bekannt und charakterisiert. Auch die Rezeptoren für BMPs und der Weg der Signaltransduktion konnte bereits entschlüsselt werden (Chen et al 2004). Von den genannten Faktoren wurden in dieser Arbeit BMP-2 und BMP-7 verwendet. Diese beiden Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei den Prozessen der Chondro- und Osteogenese.

Zur Überprüfung des für Knorpelzellen typischen Aussehens und der Kollagenproduktion der PCMOs wurden die im Folgenden aufgeführten und beschriebenen Methoden verwendet. Vielleicht könnte die Fähigkeit der PCMOs sich zu Chondrozyten zu differenzieren für die Regeneration von zerstörtem Gelenkknorpel und damit im Rahmen der Arthrosetherapie von Bedeutung sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Zellkultur

In den durchgeführten Versuchen wurden ausschließlich aus peripherem humanem Blut isolierte Monozyten verwendet. Diese wurden aus antikoaguliertem Spenderblut isoliert, in vitro dedifferenziert und in weiterer Stimulation zu Kollagen Typ II produzierenden Zellen umgewandelt.

#### 2.1.1 Isolation der Zellen

Alle im Folgenden beschriebene Schritte der Isolation wurden im keimfreien Bereich der Sterilbank (Heraeus,,Germany) durchgeführt.

Als erstes wurde das Blut im Verhältnis 1:2 in PBS (Cambrex, Veroiers, Belgium) resuspendiert und daraufhin je 35 ml dieser Suspension auf ca. 15 ml Ficoll (Biochrom AG, Berlin, Germany) geschichtet. Auf diese Weise entstanden zwei Phasen, die bei 2000 U/min (mit der Heraeus Multifuge 35R Kendro) für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert wurden. Die Monozyten setzen sich hierbei in einer Phase ab, die als Buffy coat bezeichnet wird. Der über den Monozyten liegende Überstand aus Serum wurde verworfen, der nun oben aufschwimmende Buffy coat abgenommen und in PBS resuspendiert. Das Zellgemisch wurde dann bei 1600 U/min für 10 Minuten, diesmal mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet nochmals in PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde bei 1000 U/min für 5 Minuten mit Bremse wiederholt, der Überstand nochmals abgenommen und verworfen.

### 2.1.2 Adhärenz der Zellen

Die gewonnenen Zellen wurden mit RPMI 1640 (Cambrex, Veroiers, Belgium) in folgender Kombination resuspendiert:

- AB Serum (Transfusionsmedizin, Kiel, Germany)
- 100 U ml<sup>-1</sup> Penicillin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- 100 mg ml<sup>-1</sup> Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- 2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)

Jedes Falconröhrchen (entspricht einem buffy coat, also einem Spender) wurde zuerst mit 5 ml Medium aufgefüllt und die Zellen resuspendiert. Die einzelnen Suspensionen wurden gepoolt und mit 50 ml Medium aufgefüllt.

In Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen 25cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Numbrecht, Germany) (10 ml pro Flasche) gegeben und bei 37°C im Brutschrank (Heracell 240) 1 Tag inkubiert. Die abhärenten Zellen wurden nach abnehmen des Nährmediums mit 10 ml PBS gespült.

### 2.1.3 Kultivierung/Differenzierung der Zellen

Als Nächstes wurden die Zellen über 6 Tage zu pluripotenten monozytären Stammzellen dedifferenziert. Diese Eigenschaft hatten sie zum Zeitpunkt der Isolation aus dem Blut schon verloren.

Als Dedifferenzierungsmedium wurde RPMI 1640 Medium (Cambrex Bio Whittaker, Veroiers, Belgium) mit Folgendem versetzt:

- 140 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (R&D Systems, Wiesbaden, Germany)
- 5 ng ml<sup>-1</sup> M-CSF (R&D Systems, Wiesbaden, Germany)
- 0,4 ng ml<sup>-1</sup> humanes IL-3 (R&D Systems, Wiesbaden, Germany)
- 100 U ml<sup>-1</sup> Penicillin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- 100 mg ml<sup>-1</sup> Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- AB Serum (Transfusionsmedizin, Kiel, Germany)

Nach der PBS Spülung wurden die Zellen mit Dedifferenzierungsmedium versetzt (10ml pro Flasche) und es erfolgte alle 2 Tage ein teilweiser Mediumwechsel. Am 6.

Tag wurde das Medium vollständig abgezogen und die Zellen mit 10 ml PBS gespült.

#### **2.1.4 Umsetzung in 6-Well-Platten**

Die dedifferenzierten Zellen wurden mit einem Zellschaber (16 cm, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) vorsichtig vom Boden gekratzt und aus der Kulturflasche abpipettiert. Diese Suspension wurde bei 1600 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand danach abgenommen und das Zellpallet in DMEM (Life Technology Gibco BRL, Paislay, Scotland) resuspendiert.

Zur Vorbereitung der 6-Well-Paltten (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) wurde je ein steriles Deckgläschen (15x15mm, Menzel-Gläser, Germany) in ein Well gelegt.

Auf die Deckgläschen wurden dann vorsichtig mit einer Pipette jeweils 200 µl Zellsuspension gegeben. (mit serologischen Pipetten von Sarstedt, Nümbrecht, Germany)

Um ein Haften der Zellen am Deckgläschen zu gewährleisten, wurden die Wellplatten 20 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen gesetzt hatten. Daraufhin wurden 2 ml des entsprechenden Differenzierungsmediums tropfenweise in jedes Well gegeben.

Zur Herstellung des Differenzierungsmediums wurde DMEM Medium mit Folgendem versetzt:

- 2 mM L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- 50 µg Ascorbinsäure (Merck, ,Germany)
- 100 U ml<sup>-1</sup> Penicillin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- 100 mg ml<sup>-1</sup> Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Germany)
- 50 ml FCS 10% ()
- und dem entsprechenden Wachstumsfaktor

Die Zusätze wurden aliquotiert gelagert.

FCS, L-Glutamin und P/S bei minus 20 Grad Celsius, Ascorbinsäure bei Raumtemperatur und das Grundmedium bei 4 Grad Celsius. Zuletzt wurden die nachfolgenden Wachstumsfaktoren in jeweils 20 ml Nährmedium gelöst. (Konzentrationen wie unten beschrieben)

### BMP-2 und BMP-7 (R&D Systems)

10000 ng Substrat wurde in 100 µl BSA (s.o.) gelöst und daraus 5 Aliquots (1:10 =100µg/ml) mit jeweils 20 µl hergestellt. Zur Herstellung des gebrauchsfertigen Differenzierungsmediums wurde 1 Aliquot in 20 ml Medium (1:10000 =100ng/ml) gelöst.

Die Aliquots wurden bei minus 20 Grad Celsius in autoklavierten Eppendorf-Tubes aufbewahrt.

### **2.1.5 Versorgung der Zellen**

Während der Kultivierung über mehrere Wochen (je nach Versuch) wurde zur Kontrolle, die Struktur und Morphologie der Zellen alle 2 Tage unter dem Lichtmikroskop (Carl Zeiss, Jena, Germany) in vierzigfacher Vergrößerung beurteilt. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Hierzu wurden 3 ml des verbrauchten Mediums abgenommen und durch die gleiche Menge neuen Mediums ersetzt.

### **2.1.6 Abbruch der Kultivierung**

Jede Woche wurde die Differenzierung (Stimulation und negativ Kontrolle) abgebrochen. Durch dieses Vorgehen ließ sich ein Verlauf der Differenzierung gut dokumentieren.

Zu diesem Zweck wurde das Medium abgenommen und in 15 ml Falconröhrchen (Cellstar/Greiner, Frickenhausen, Germany) überführt, welche bei minus 20 Grad Celsius für die ELISA Analyse eingefroren wurden.

Die Deckgläschen wurden mit 5 ml PBS pro Well 2x gespült und für die Immunhistochemie mit 3 ml 4% Formaldehyd, und für die elektronenmikroskopische Aufnahmen mit 3 ml 5% Glutharaldehyd fixiert. Diese wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

## **2.2 Immunhistochemische Methoden**

Durch immunhistochemische Färbung wird ein spezifisches Antigen, durch Bildung eines Antigen-Antikörper, Komplexes plus Kopplung eines Farbstoffs, sichtbar gemacht. Anfärbung im Präparat ist damit gleichbedeutend mit einem positiven Nachweis des Antigens, das an den spezifischen Antikörper gebunden wurde.

In dieser Arbeit wurden spezifisch Kollagen I und II angefärbt, um damit den Nachweis der zelleigenen Produktion von Kollagen zu erbringen. Auch zur Anfärbung eines Stammzellmarker (CD14) wurde sich der Immunhistochemie bedient. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden beschrieben.

### **2.2.1 Kollagen Typ I und II Färbung**

Das unter 2.1. 6 genannte Deckgläschen wurde mit TBS Puffer (Cambrex, Veroiers, Belgium) 3 Mal gespült. Danach 20 Minuten mit 0,6 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in Methanol) inkubiert und erneut mit TBS gewaschen.

Das vom Nährmedium befreite und für die Färbung fixierte Deckgläschen, wurde mit Kollagen Typ I oder II Antikörper (Holmendahl) 1:10 verdünnt, für eine Stunde, bei 8 °C gelagert. Es wurde immer eine Negativ-Kontrolle mit inkubiert. Die Deckgläschen wurden anschließend mit TBS gespült.

Es folgte die Kopplungsreaktion mit dem HRP (rabbit oder mouse) Antikörper, die zur Bindung des Farbstoffes Voraussetzung ist. Hierfür wurden die Deckgläschen mit dem Antikörper (Verdünnung 1:10) für 30 min im Kühlschrank, bei 8 °C inkubiert.

Wieder erfolgte die Waschung mit TBS.

Als Letztes erfolgte der Inkubationsschritt mit AEC Substrat, das für die Entstehung des Farbstoffes verantwortlich ist. Nach Zugabe des Substrates wurde die Reaktion bei deutlich sichtbarer Rotfärbung mit Aqua dest. Spülung abgestoppt. Der Reaktionszeitraum war auf 4 bis maximal 20 min begrenzt.

Es folgte die Eindeckelung mit Aquatex.

Die fixierten Zellen wurden lichtmikroskopisch betrachtet und vergleichbare Stellen wurden fotografiert.

### 2.2.2 CD 14 Färbung

CD 14 ist ein Marker der monozytären myeloischen Reihe, der nur bei pluripotenten Zellen nachweisbar ist. Die Färbung dieses Markers gibt also Aufschluss darüber, ob bei einer Zelle Stammzellpotenzial vorhanden ist.

- a) Zur Vorbehandlung der Zellen wurden die Deckgläschen in 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Raumtemperatur 5 min lang fixiert und dann für 20 min in 10% AB/TBS inkubiert. Danach wurde mit TBS gründlich gespült
- b) Die Zellen wurden 45 min mit CD 14 Antikörper in der Verdünnung 1:100, bei Raumtemperatur inkubiert und danach wiederum mit TBS gespült. Weitere 40 min Inkubation mit E 354 Strept-Avidin-Biotin (1:100) und 10% AB/TBS (Ko 377), (wobei A  $5\mu\text{l}$  + B  $5\mu\text{l}$  +  $990\mu\text{l}$  TBS) folgten. Danach wurde erneut mit TBS gespült.
- c) Um die Vektor Entwicklung durchführen zu können musste zuerst der Entwickler hergestellt werden. Hierzu wurden 5 ml der Grundentwicklerlösung zur Aktivierung mit folgendem versetzt:
  - 2 Tropfen Puffer
  - 4 Tropfen DAB
  - 2 Tropfen Hydrogenperoxidase
  - 2 Tropfen Nickellösung
 Nach jeder Zugabe wurde die Lösung kurz gevortext.  
 Die jetzt aktivierte Entwicklerlösung wurde auf die Deckgläschen getropft und so lange inkubiert, bis die rote Färbung deutlich sichtbar war. Zum Abbruch wurde die Entwicklerlösung entfernt und mit TBS gespült.
- d) Die Einbettung erfolgte in Kaiser`s Glyceringelantine auf einem Objektträger.

### **2.2.3. Elektronenmikroskopie**

Diese Form der Mikroskopie basiert auf der Wechselwirkung von Elektronen mit den Atomen des zu mikroskopierenden Materials. Im Innern des Mikroskops herrscht ein Hochvakuum, in dem die Elektronen durch Hochspannung auf enorme Geschwindigkeiten beschleunigt werden können. Diese beschleunigten Elektronen lassen sich mit Hilfe von elektromagnetischen Feldern, dann fast wie Lichtstrahlen durch Linsen fokussieren. Durch diese Technik erhält das Bild eine sehr hohe Auflösung und es lassen sich Mikroelemente des zu untersuchenden Materials darstellen.

Mikroskopiert wurde mit einem Zeiss 902 Elektronenmikroskop.

Die Zellen wurden wie in 2.1.6 beschrieben behandelt und dann in 4% Glutaraldehyd fixiert. Danach wurden sie eingebettet und mit einer Schicht aus Nickel bedampft, die die elektrische Leitfähigkeit gewährleistet.

Der Elektronenstrahl wird während der Mikroskopie zeilenförmig über das Objekt bewegt, wobei die von Strahl getroffenen Objektpunkte niederenergetische Sekundärelektronen emittieren. Diese Sekundärelektronen werden Mittels eines Kollektors detektiert. Aus diesem Sekundärelektronensignal werden die einzelnen Helligkeiten und damit Graustufen moduliert, wodurch man ein äußerst plastisches Bild der Oberfläche erhält.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 RNA Isolierung nach der Ein-Schritt-Methode**

Die RNA dient als Matrize zur Herstellung eines Amplifikats durch die PCR. Kann man das auf diese Weise entstandene Amplifikat nachweisen, so könnte auch das in der untersuchten Zelle gesuchte Protein exprimiert werden.

Hierbei muss strengstens darauf geachtet werden, das zu untersuchende Zellmaterial nicht durch Fremd-RNA zu verunreinigen oder durch den Kontakt mit RNase zu zerstören. Zu diesem Zweck wurde ausschließlich mit RNase freien Materialien gearbeitet, die soweit wie möglich mit Diethylpyrocarbonat vorbehandelt wurden oder aus sterilen Kunststoffen bestanden und nur einmal verwendet wurden.

Die in Zellkulturflaschen adhärenen Zellen wurden vom Kulturmedium befreit und gründlich mit PBS Puffer gespült. Nach diesem Waschschrift wurde der Lysispuffer, bestehend aus Guanidinium Thiocyanat Lösung (Fluka #50981) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma) direkt auf die Zellen gegeben (1ml Lysispuffer pro  $1 \times 10^6$ ). Das Lysat wurde durch wiederholtes Aufziehen in die Pipette homogenisiert. Dies dient der guten Durchmischung, um eine möglichst vollständige Fragmentierung der genomischen DNA zu erreichen.

Die Lösung wurde in Eppendorf Gefäße (1,5ml) umgefüllt und mit 50 $\mu$ l 2M Natriumacetatlösung (pH4) (Merck) versetzt und gevortext. Dann wurden 500 $\mu$ l H<sub>2</sub>O gesättigtes Phenol zugegeben und vermischt. Es folgte die Zugabe von 100 $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) (Merck) und erneutes vortexen. Das Gemisch wurde 15 min auf Eis inkubiert und danach bei 4°C und 10000 x g für 10 min zentrifugiert. Die entstandene wässrige Phase wurde vorsichtig und vollständig abpipettiert. RNA ist in wässriger Lösung schwer löslich, dies ändert sich bei pH 4 und gleichzeitiger Lösung mit Phenol/Chloroform.

Zur Ausfällung der DNA wurden 500 $\mu$ l 100% Isopropanol mit dem Lysat vermischt und für 30 min bei -20°C inkubiert.

Durch Zentrifugation bei 4°C und 10000 x g für 10 min, wurde die DNA von der Flüssigkeit getrennt und als Pellet am Grund des Eppendorfgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet in 500 $\mu$ l 75% Ethanol resuspendiert und für 15min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde nochmals bei 4°C für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt diente zur Entfernung verbliebener Guanidinium Thiocyanat Reste.

Als letzter Schritt folgte, nach Entfernung des Überstandes, die Trocknung der RNA bei Raumtemperatur (ca. 10 min) und erneute Resuspension in 50-100 $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Die Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und dann zur weiteren Analyse durch das PCR Verfahren verwendet.

## 2.3.2 PCR (Polymerase Kettenreaktion)

### 2.3.2.1 Ein-Schritt RT-PCR

Das Prinzip der Durchführung einer RT-PCR in einem Schritt, verringert die Kontaminationsmöglichkeiten während des Versuches erheblich. Folglich wird der Einfluss äußerer Störgrößen minimiert, während die Ausbeute maximiert werden kann.

Auf Grund des oben beschriebenen Prinzips, wurden alle Komponenten, sowohl der Reversen Transkription, als auch der Polymerasekettenreaktion zusammen in Lösung gebracht und mit der RNA Probe versetzt. Zum Start der Reversen Transkriptase werden die Proben auf 50 °C für 30 Minuten erhitzt. Die Konformationsänderung der Taq-Polymerase und damit ihre Aktivierung, werden durch einen Temperaturanstieg auf 95 °C für 15 Minuten gewährleistet und gleichzeitig die Reverse Transkriptase durch Denaturierung inaktiviert.

Alle unspezifischen Bindungen der Primer werden verhindert, so dass optimale Voraussetzungen für die folgenden Reaktionszyklen geschaffen werden.

Die gewonnene RNA wurde auf das Vorhandensein von Kollagen Typ I, II und X hin untersucht. Die unten aufgeführten Primersequenzen wurden verwendet, wobei nach tabellarisch dargestellten Schema vorgegangen wurde (s. Tabelle 10).

Zur Kontrolle wurde separat eine RT-PCR für Glyceraldehyd – 3 – Phosphat – Dehydrogenase (GAPDH), mit einem Intron überspannenden Primerpaar durchgeführt.

Durchführungsprotokoll für den Nachweis von Kollagen Typ I,II und X

Reverse Transkription	30 min 50 °C
PCR-Aktivierung/ RT-Inaktivierung	15 min 95 °C
Cyclus: Denaturierung	45 sek 94 °C
Annealingtemperatur	45 sek 68,5 °C
Elongationtemperatur	60 sek 72 °C
Cyclenzahl: 40 mal	
Abschließende Elongation	10 min 72 °C

Tabelle 1: Ablauf der Ein-Schritt RT-PCR

Primer	Sequenz
Kollagen Typ I sense	5'GCG-GAA-TTC-CCC-CAG-CCA-CCA-AGA-GTC-3'
Kollagen Typ I antisense	5'CAG-TGC-CAT-CGT-CAT-CGC-ACA-ACA-CCT-3'
Kollagen Typ II sense	5'CAG-TGC-CAT-CCA-CGA-GCA-CCA-GCA-CTT-3'
Kollagen Typ II antisense	5'GTC-CCC-GTG-GCC-TCC-CCG-3'
Kollagen Typ X sense	5'AGC-CAG-GGT-TGC-CAG-GAC-CA-3'
Kollagen Typ X antisense	5'TTT-TCC-CAC-TCC-AGG-AGG-GC-3'

Tabelle 2: Auflistung der Sequenzen der verwendeten Primerpaare.

	Cyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation
Kollagen I	40 mal	94 °C; 30 sek	68,5 °C; 30 sek	72 °C; 60 sek
Kollagen II	40 mal	94 °C; 30 sek	68,5 °C; 30 sek	72 °C; 60 sek
Kollagen X	35 mal	94 °C; 30 sek	62,5 °C; sek	72 °C; 60 sek

Tabelle 3: Kurzfassung für die Bedingungen der durchgeführten RT-PCRs.

Die Produkte wurden mit Agarosegel Elektrophorese und in direkter Sequenzierung mit der „Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing“ Methode, die mit dem Prinzip einer ABI PRISM 310 genetische Analyse arbeitet (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) untersucht.

### 2.3.2.2 Echtzeit RT-PCR (rtRT-PCR)

Die Echtzeit RT-PCR ist im Gegenteil zur normalen RT-PCR (wie oben beschrieben), nicht nur in der Lage einen klaren Nachweis des Vorhandenseins eines bestimmten Gens zu erbringen, sondern auch seine Expression zu quantifizieren. In diesem Fall wurden wieder die Expression von Kollagen I, II und X gemessen.

Für die Echtzeit RT-PCR wurden die PCMOs wie in Kapitel 2.1. beschrieben behandelt und ihre RNA isoliert. Dies erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Total RNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany), wie im Protokoll beschrieben.

100ng der auf diese Weise isolierten RNA wurden auch hier mit dem Prinzip einer Ein Schritt RT-PCR untersucht.

Der zur Messung der Genexpression verwendete ABI Cyclyer 7700 (Applied Biosystems, Germany) wurde, wie im Standardprotokoll beschrieben verwendet. Während der Extension wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikation zu bestätigen.

Durch Bestimmung der  $\beta$ -Aktin Expression, wurde ein Vergleichspunkt geschaffen, um die Expression der Kollagene in Relation quantifizieren zu können.

Durchführungsprotokoll für den quantitativen Nachweis von Kollagen Typ I, II und X

Reverse Transkription	30 min 50 °C
PCR-Aktivierung/ RT-Inaktivierung	15 min 95 °C
Cyclus: Denaturierung	30 sek 94 °C
Annealingtemperatur	30 sek 50-60 °C
Elongationstemperatur	30 sek 72 °C
Cyclenzahl: 40 mal	
Abschließende Elongation	Optional 15 sek x °C

Tabelle 4: Ablauf der Echtzeit RT-PCR

Primer	Sequenz
Kollagen Typ I sense	5'GCG-GAA-TTC-CCC-CAG-CCA-CCA-AGA-GTC-3'
Kollagen Typ I antisense	5'CAG-TGC-CAT-CGT-CAT-CGC-ACA-ACA-CCT-3'
Kollagen Typ II sense	5'CAG-TGC-CAT-CCA-CGA-GCA-CCA-GCA-CTT-3'
Kollagen Typ II antisense	5'GTC-CCC-GTG-GCC-TCC-CCG-3'
Kollagen Typ X sense	5'AGC-CAG-GGT-TGC-CAG-GAC-CA-3'
Kollagen Typ X antisense	5'TTT-TCC-CAC-TCC-AGG-AGG-GC-3'

Tabelle 5: Auflistung der Sequenzen der verwendeten Primerpaare.

β-Aktin Primer	Primersequenzen
Primer sense	5'-CTC-CTT-AAT-GTC-ACG-CAG-GAT-TTC-3'
Primer antisense	5'-GTG-GGG-GCG-CCC-CAG-GCA-CCA-3'

Tabelle 6: Auflistung der zur Quantifizierung verwendeten Primerpaare

### 2.3.3 Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Das Prinzip des ELISA bietet, als eine wissenschaftlich anerkannte Methode, die Möglichkeit der Quantifizierung von Proteinmengen.

Eine Mikrotiterplatte wird mit einem spezifischen Fang-Antikörper beschichtet, der mit seinem Fc-Teil unspezifisch am Boden der Mikrotiterplatte bindet. Der noch freie Fab-Teil bildet die spezifische Bindungsstelle für das gesuchte Protein. Die Lösung mit dem nachzuweisenden Protein wird zugegeben. Der auf diese Weise entstandene Protein Antikörper Komplex, muss mit einem biotinylierten Detektionsantikörper gekoppelt werden, der ebenfalls spezifisch bindet. Um eine Protein-Quantifizierung gewährleisten zu können, muss die Kopplung mit einem Enzym erfolgen, dessen Reaktion photometrisch gemessen werden kann.

#### 2.3.3.1 Verwendete Komponenten

Verwendet wurde das ELISA Kit von MD Biosciences (Chondrex):  
Human/Monkey IgG Anti Typ I und II Collagen Antibody Assay Kit

Fangantikörper (capture antibody)	Maus anti humanes Kollagen Typ I oder Typ II Antikörper (monoklonal)
Detektionsantikörper (detection antibody)	Biotin konjugierter Antikörper von Zeige gegen Maus Ig G (polyklonal)

Tabelle 7: Antikörper des ELISA Systems.

Waschpuffer 20 x	50 ml auf 1l destilliertes Wasser
Blocking-Reagenz (Solution A)	
Standrad Dilutions Puffer (Solution B)	
Dilutions Puffer des zweiten Antikörpers (Solution C1)	
Streptavidin Peroxidase Dilutions Puffer (Solution C2)	
Streptavidinperoxidase	
Substrat	OPD Chromagen + Urea H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf 20 ml H <sub>2</sub> O dest.
Stop-Lösung	2,5 N Sulfuric Säure
Standard	
Platten	Kollagen Typ I+II beschichtete 96 well

Tabelle 8: Puffer, Lösungen und Platten für den Sandwich-ELISA.

### 2.3.3.2 Vorbereitung der Mikrotiterplatte

Die Mikrotiterplatten dieses ELISA waren mit Fangantikörper (AK1) für Typ I und Typ II Kollagen vorbeschichtet. Die einzelnen Platten boten Platz für die Kontrolle von fünf Proben, wobei immer eine negative Kontrolle auf unbeschichteter Platte parallel durchgeführt wurde. Pro Platte wurden zwei Standardreihen als Referenz pepittiert. Die Platten mussten gewaschen (3x mit Waschpuffer) und danach das erste Blocking Reagenz (100µl Solution A pro Well für 1h bei Raumtemperatur) pepittiert werden. Die Platten wurden dann erneut 3x mit Waschpuffer gewaschen und im Anschluss die Proben (Überstände) aufgebracht.

### 2.3.3.3 Probenvorbereitung

Die eingefrorenen Überstände (s. 2.1.3) wurden aufgetaut und verdünnt:

1. 500 µl Probe = 16 unit/ml → Verdünnung 1:1
2. 250 µl aus Probe 1 + 250 µl Dilutions Puffer B = 8 unit/ml → Verdünnung 1:1
3. 250 µl aus Probe 2 + 250 µl Dilutions Puffer B = 4 unit/ml → Verdünnung 1:1
4. usw.

weiter erforderlich Konzentrationen waren: 2 U/ml, 1 U/ml, 0,5 U/ml, 0,25 U/ml

Die Proben selber wurden vorher nicht zusätzlich verdünnt.

### 2.3.3.4 Protokoll für die Durchführung des ELISAs

Die Proben und der Standard wurden, genau wie der Leerwert, auf die Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Es wurden jeweils 100 µl Lösung B für den Leerwert, 100 µl der einzelnen Proben und 100 µl Standard pro Well eingebracht.

Am Nächsten Morgen wurden die Platten 6x mit Waschpuffer gespült und mit dem zweiten Antikörper versehen. Dieser wurde in 100 ml Zweit-AK-Dilutions-Puffer (Lösung C1) gelöst und zu je 100µl pro Well pipettiert. Auf diese Art präpariert, wurden die Platten für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach aufs Neue 6x gewaschen. 50µl Streptavidin-Peroxidase in 10 ml Streptavidin-Peroxidase Dilutions Puffer (Lösung C2) gelöst wurden zu je 100µl pro Well auf die Platte gegeben. Die Platten wurden dann für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum 6x mit Waschpuffer gewaschen.

Es folgte die Substratzugabe. Hierzu wurde eine Tablette  $H_2O_2$  und eine Tablette OPD in 20ml destilliertem Wasser gelöst und dann je 100 µl OPD-Urea  $H_2O_2$  pro Well pipettiert. Die ablaufende Reaktion wurde nach 30 min durch ein Stopp Reagenz (Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ), 50 µl pro Well) beendet.

Das bis zu diesem Zeitpunkt umgesetzte Substrat, konnte nun photometrisch ermittelt und so auf die Konzentration des Proteins rückgeschlossen werden.

Die Photometrie wurde auf 490nm eingestellt, wobei der Referenzwert bei 650nm ermittelt wurde.

### 2.3.3.5 Auswertung der Messung

Die Kollagen Typ I und II Konzentrationen der Proben wurde aus der Regressionsgeraden der Standardkurve ermittelt, die eine Linearität bis zu 1000pg/ml aufwies. Durch diese Messung konnten also Konzentrationen bis 1000pg/ml zuverlässig ermittelt werden.

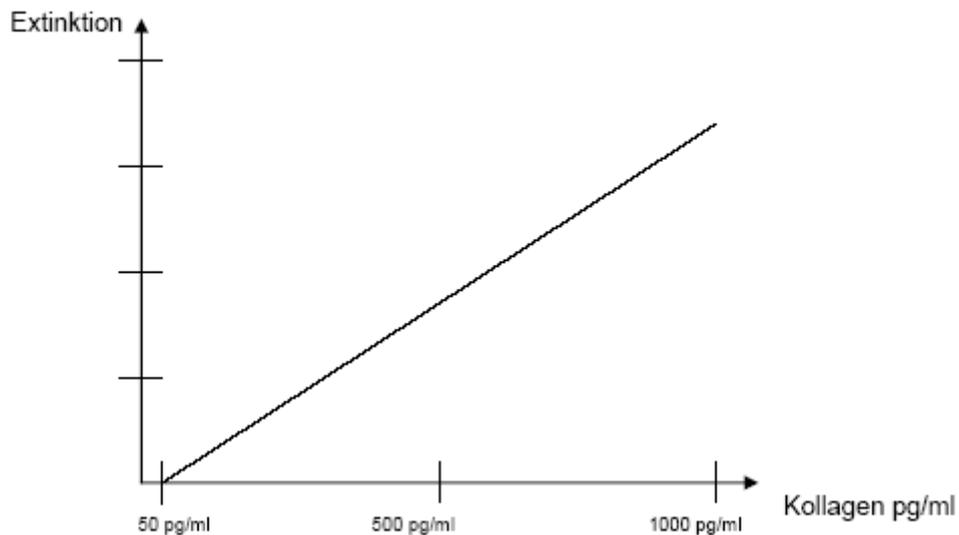


Abb.2.1: Ermittlung der Kollagen Typ I und II Konzentration mit Hilfe der Regressionsgeraden der Standardkurve

## 2.4 Statistik

Alle erhobenen explorativen Signifikanzen wurden mittels t-Test für paarig abhängige/unabhängige, verbundene und unverbundene Stichproben berechnet. Signifikanz besteht, wenn  $p \leq 0,05$ . Verwendetes Statistik Programm: JMP Statistic Programms (SAS Institute, Cary, NC, USA)

### 3. Ergebnisse

In all den unter Material und Methoden vorgestellten und verwendeten Verfahren ging es darum zu zeigen, dass PCMOs das Potential haben, sich bei Stimulation mit BMP-7 und BMP-2 zu Kollagen Typ II produzierenden, chondrozytären Zellen zu entwickeln. Außerdem musste auch die Veränderung der Zellmorphie und das Vorhandensein des genetischen Äquivalents im Zellkern gezeigt werden, um abschließend eine vollständige Umwandlung der Zellen beweisen zu können.

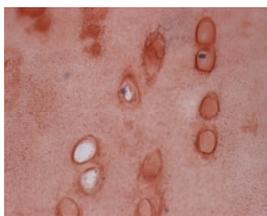
#### 3.1. Nachweis der Produktion von Kollagen Typ I und Typ II im Rahmen einer immunhistochemischen Färbung

Durch die Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ I und Typ II im Verlauf der Stimulation sollte die Entwicklung der PMCOs zu Kollagen produzierenden Zellen gezeigt werden.

Als Positivkontrolle, in allen Ansätzen, wurde Gelenkknorpel verwendet. Der deutliche Nachweis von Kollagen Typ II zeigte sich durch eine kräftige Rotfärbung.

Als Negativkontrolle dienten nur mit Dedifferenzierungsmedium behandelte PCMOs, die keinerlei Anfärbbarkeit für Kollagen Typ II zeigten. Weder nach vier noch nach sechs Wochen.

Positivkontrolle



Negativkontrolle

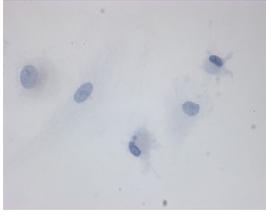


**Abb. 3.1.1 Immunhistochemische Färbung für Kollagen Typ II, Positivkontrolle: Chondrocyten, Negativkontrolle: Chondrozyten gefärbt ohne 1 AK**

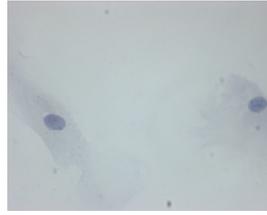
Um eine stimulierende Wirkung, des Mediums auszuschließen wurden auch Mediumkontrollen angefärbt. Wobei die PCMOs ausschließlich mit Dedifferenzierungsmedium und Differenzierungsmedium, ohne die zu untersuchenden Wachstumsfaktoren, versetzt wurden. In den Mediumkontrollen ließ sich weder nach vier-, noch nach sechswöchiger Inkubationszeit Kollagen Typ II nachweisen.

## Mediumkontrollen

4 Wochen



6 Wochen

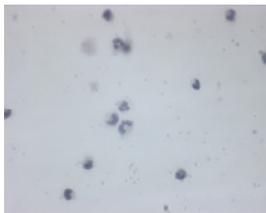


**Abb. 3.1.2 Immunhistochemische Färbung für Kollagen Typ II, Mediumkontrollen: PCMOs ohne Stimulation nur in Medium nach 4 und 6 Wochen**

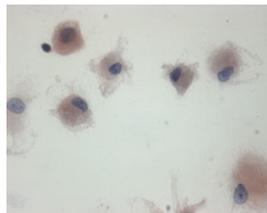
In der Immunhistochemischen Färbung der Zellen zum Nachweis von Kollagen Typ I und II zeigte sich bei allen mit BMP-2 stimulierten Zellen eine immunopositive Reaktion für beide Kollagentypen. Die Gruppe der mit BMP-7 stimulierten Zellen zeigte dagegen, eine wesentlich schwächere Immunreaktion, war aber positiv. Diese erste Färbung der Versuchsreihe erfolgte nach vierwöchiger Stimulation.

## PCMOs

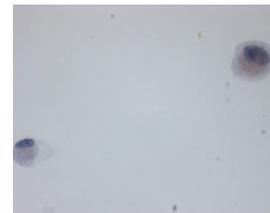
0 Wochen



4 Wochen BMP-2



4 Wochen BMP-7



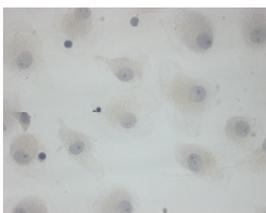
**Abb. 3.1.3 Immunhistochemische Färbung für Kollagen Typ II, PCMOs unter Stimulation mit BMP-2 und BMP-7 nach 4 Wochen.**

Die BMP-2 Stimulation zeigte eine stärkere Induktion der Expression von Kollagen Typ II als Stimulation mit BMP-7

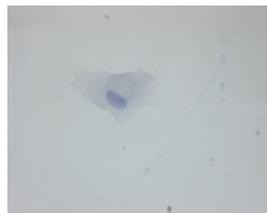
Die Zellen produzierten allerdings nach vierwöchiger Stimulation beide Arten von Kollagen, was für Knorpelzellen nicht typisch ist, da diese wesentlich mehr Kollagen Typ II produzieren, als Kollagen Typ I. Daraufhin wurde die Stimulationszeit der Zellen verlängert, um das Verschwinden der Expression von Kollagen Typ I zu dokumentieren.

## PCMOs

1 Woche BMP-7



6 Wochen BMP-7



**Abb. 3.1.4 Immunhistochemische Färbung für Kollagen Typ I, exemplarisch PCMOs unter Stimulation mit BMP-7 nach 6 Wochen.**

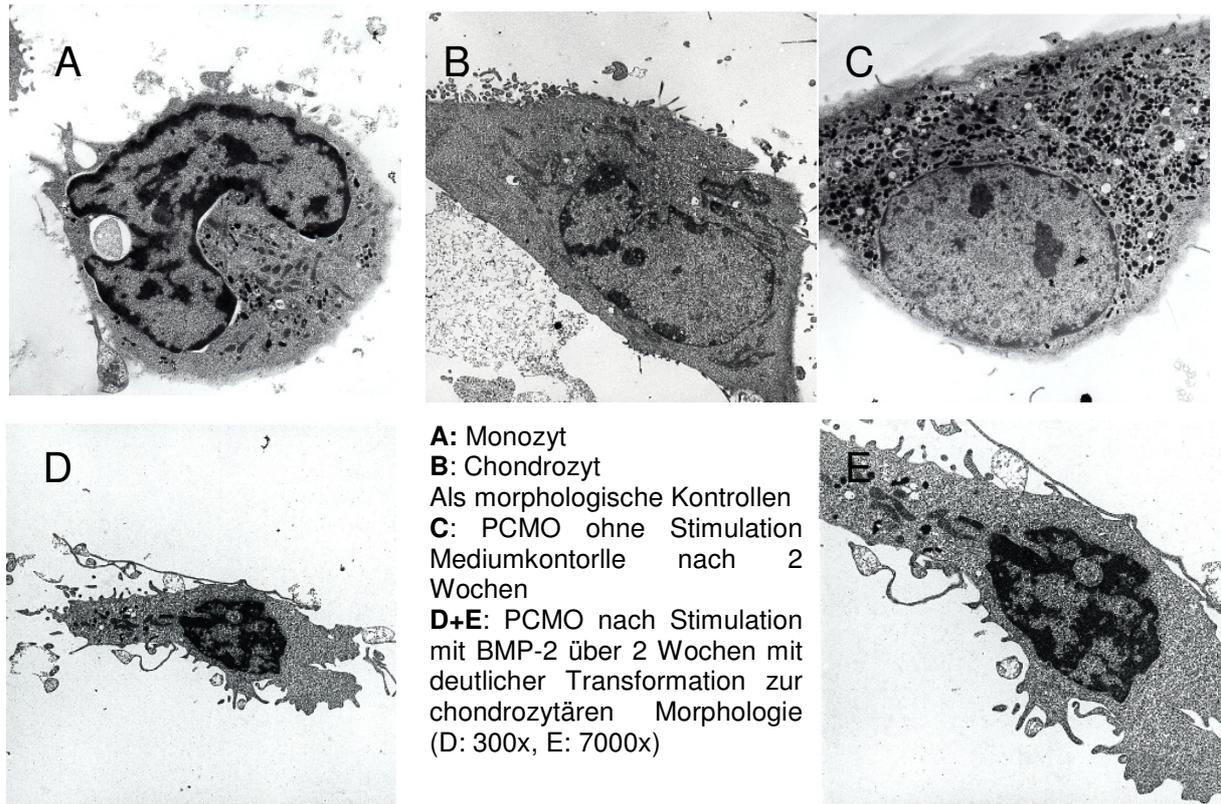
Nach 6 wöchiger Stimulation konnte ein Verschwinden der Kollagen Typ I Expression beobachtet werden

In weiteren Stimulationen wurden zur besseren Verlaufskontrolle, immer in wöchentlichen Abständen, PCMOs zum Nachweis für Kollagen Typ I und II, mit der oben beschriebenen Methode angefärbt. Hierbei zeigte sich eindeutig, dass sich die Anfärbung von Kollagen Typ I in ihrer Intensität über die Wochen verringerte, bis sie in der sechsten Woche völlig verschwand. Dies war sowohl bei den mit BMP-2 stimulierten, als auch bei denen mit BMP-7 stimulierten Zellen der Fall.

Die Färbung von CD 14 erfolgte zum Beweis des Stammzellcharakters der PCMO. CD 14 ist einer von vielen Stammzellmarkern und sollte daher während der Stimulation mit Wachstumsfaktoren und der damit einhergehenden Differenzierung der Zelle, immer weniger in der Zellmembran nachweisbar sein. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass der CD14 Rezeptor in der Zelle, im Laufe der Stimulation, weniger exprimiert wird. Die Färbungen waren in jeder Woche der Stimulation eindeutig positiv. Lediglich die Intensität der Färbung nahm in minimalem Maße ab. Gefärbt wurde jede Woche, auch in den ersten vier Stimmulationswochen.

### **3.2. Darstellung der morphologischen Veränderung von PMCOs unter Stimulation durch BMP-7 und BMP-2, mittels Elektronenmikroskopie**

In der morphologischen Untersuchung der PCMOs mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigten sich eindeutige Veränderungen der Ultrastruktur der untersuchten Zellen. Während der Differenzierung von Monozyten zu Chondrozyten wurden elektronenmikroskopisch, mit der Zeit die für Chondrozyten typischen morphologischen Korrelate sichtbar. Dabei ist zu bemerken, dass alle Zellen an Tag 0 der Stimulation eine monozytäre Morphologie aufwiesen und sich die ersten Zeichen, einer chondrozytären Morphologie, erstmals nach 14 Tagen Stimulation mit Wachstumsfaktoren zeigten. Bei keinem der beiden Wachstumsfaktoren war im Verlauf der Stimulation ein Unterschied in der morphologischen Differenzierung sichtbar. Die Zellen beider Versuchsreihen wiesen nach 14 Tagen eine chondrozytäre Morphologie auf. In allen fixierten Präparaten, die hingegen nicht mit Wachstumsfaktoren stimuliert worden waren, zeigten sich keinerlei Veränderungen. Hier blieb die ursprünglich monozytäre Form der PCMOs erhalten.



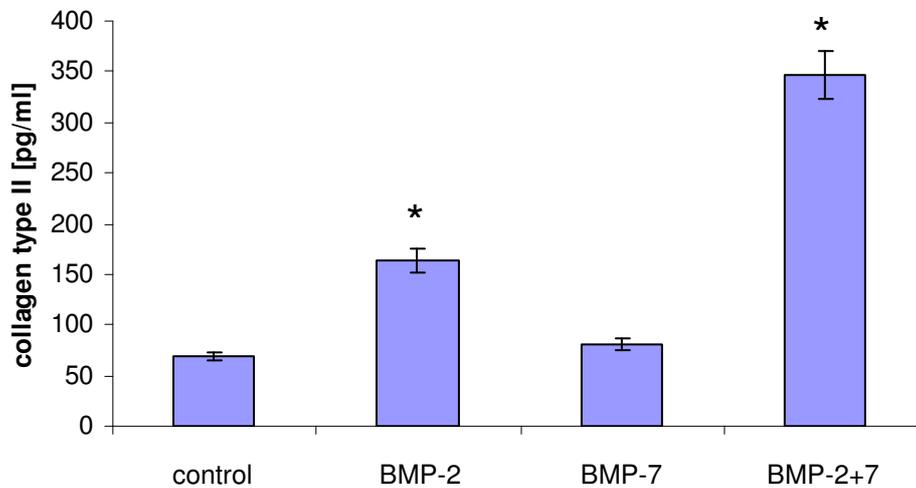
**Abb. 3.2.1** Transmissionselektronenmikroskopische Bilder

### **3.3. Quantitativer Nachweis der Kollagen Typ II Produktion im Restmedium der PCMOs durch ELISA**

Der quantitative Nachweis der Kollagen Typ II Produktion der PCMOs, unter Stimulation mit BMP-2 und BMP-7, erfolgte mit Hilfe des ELISAs. Hierfür wurden die Mediumüberstände verwendet. Die Kollagen Typ II Produktion war schon nach der zweiten Woche messbar, verstärkte sich im Stimulationsverlauf und erreichte nach 4 Wochen ihren höchsten gemessenen Wert, der bei weiterer Stimulation nicht überschritten wurde.

Für BMP-2 betrug der Wert nach 4 Wochen Stimulation 163 pg/mg, für BMP-7 war der erzielte Wert jedoch im Vergleich zur Mediumkontrolle vernachlässigbar klein. In

der Kombination von BMP-2 und BMP-7 zeigte sich allerdings ein deutlicher synergistischer Effekt. Hier lag der Wert nach 4-wöchiger Stimulation bei 347pg/ml.



**Abb.3.3.1: Kollagen Typ II Produktion der PCMOs nach 4 wöchiger Stimulation mit BMP-2, BMP-7 und deren Kombination.**

Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Sekretion von Kollagen Typ II unter Stimulation mit BMP-2 und der Kombination von BMP-2 und BMP-7, (\* = $p < 0,01$ )

(control: 65 pg/ml, BMP-2: 163pg/ml, BMP-7: 79 pg/ml, BMP-7 + -2: 347pg/ml).

Die Stimulation mit BMP-2 und BMP-7 über 6 Wochen zeigte keine verstärkte Sekretion von Kollagen Typ II im Vergleich zur Stimulation über 4 Wochen. Die Kollagen Typ I Sekretion zeigte nach 1 Woche eine Induktion der Sekretion, entsprach nach zwei- und auch nach sechswöchiger Stimulation mit BMP-2 und BMP-7 aber wieder der Sekretion der Mediumkontrolle.

### **3.4. Nachweis von Kollagen Typ I und II mRNA mittels RT-PCR nach Stimulation der PCMOs mit BMP-2 und BMP-7**

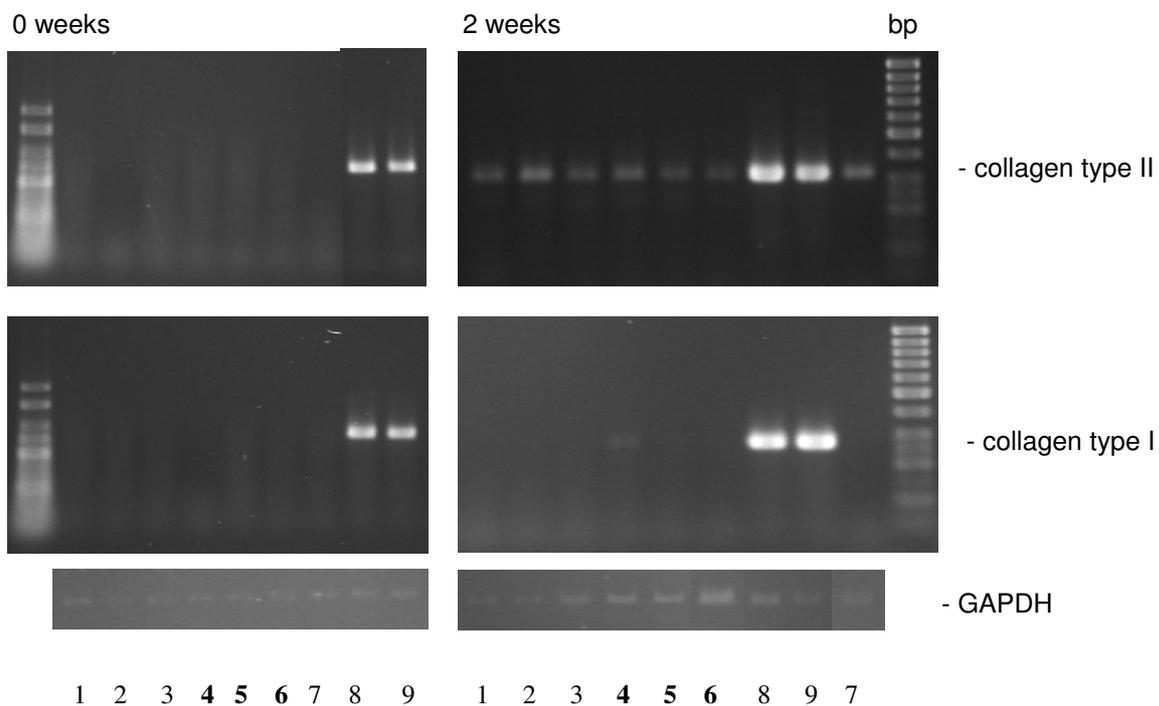
Zur Bestimmung von Kollagen Typ I und II mRNA wurde die Methode der RT-PCR verwendet.

Als Positivkontrolle bei dieser Untersuchung diente T/C-28a2/a4 und C-28/I2. Die Amplifikation der mRNA erfolgte mit spezifischen Primern für Kollagen Typ I und II, sowie mit GAPDH, um die Intaktheit der mRNA und die Abwesenheit von kontaminierender DNA genauestens zu kontrollieren.

Die Größe der PCR Produkte stimmte mit der zu Erwartenden überein. Sie betrug für Kollagen Typ I und II 261 bzw. 307 Basenpaare, wobei die Basenpaare Ihrerseits, durch Sequenzierung noch einmal überprüft wurden.

Die PCMOs wurden direkt daraufhin untersucht und es fand sich bei allen verwendeten Wachstumsfaktoren, zum ersten Mal nach zweiwöchiger Stimulation, ein klarer qualitativer Nachweis von Kollagen Typ II mRNA.

Kollagen Typ I mRNA ließ sich nur in der allein mit BMP-2 stimulierten Probe nachweisen.



**Abb. 3.4.1: Nachweis von Kollagen Typ I und II mRNA in der RT-PCR nach entsprechender Wachstumsfaktorstimulation nach 2 Wochen.**

**Bande 4** zeigt eine leichte Expression von sowohl Kollagen Typ I und II unter BMP-2 Stimulation, **Bande 5** (BMP-7) und **Bande 6** (BMP-2+-7) zeigen beide keine Expression von Kollagen Typ I und leichte Expression von Kollagen Typ II.

(1: TGF- $\beta$ 1; 2: IGF-1; 3: TGF- $\beta$ 1+IGF-1; 8: T/C 28a2/a4; 9: C-28/I2)

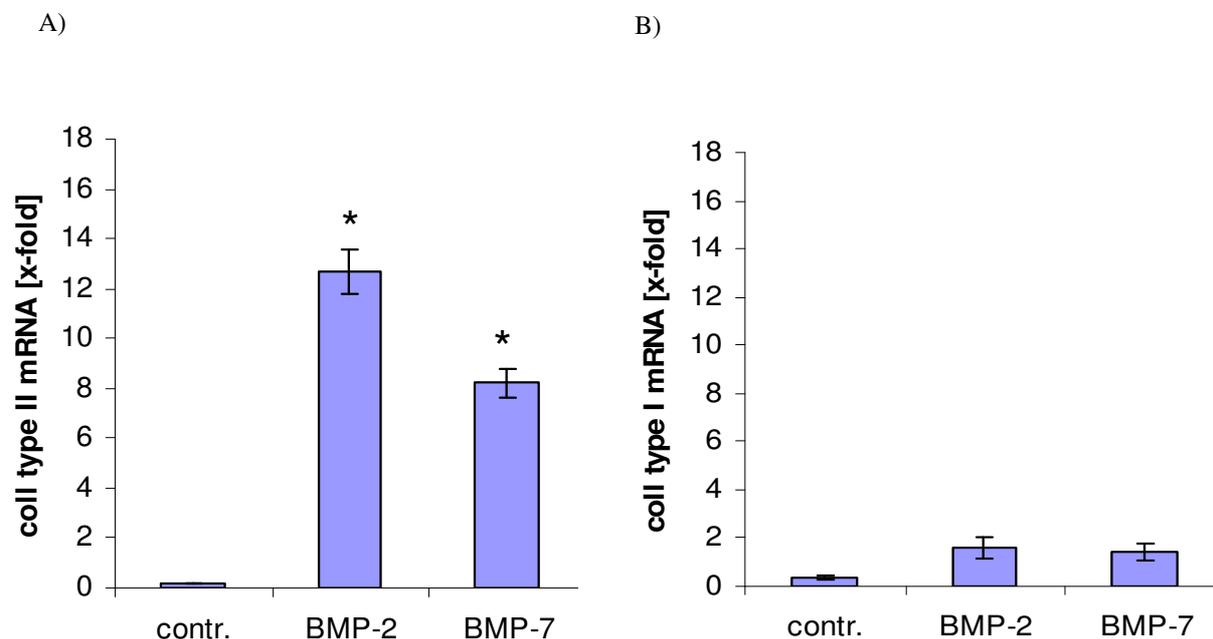
Die Stärke der Fluoreszenz der einzelnen Banden repräsentiert die Menge, die in der Probe nachgewiesene mRNA für das jeweils untersuchte Kollagen. Bande 4 der Abb. 3.4.1 zeigt hier die Quantität der mRNA für Kollagen Typ I und II, in den mit BMP-2 stimulierten PCMOs, sowie Bande 5 für die mit BMP-7 stimulierten Zellen. Bande 6 spiegelt das Ergebnis der mit der Kombination aus BMP-2 und BMP-7

stimulierten Zellen. Bande 8 und 9 zeigen die Ergebnisse der beiden Positivkontrollen T/C-28a2/a4 und C-28/12.

Auf die Ergebnisse der anderen Banden wird im Rahmen der Diskussion vergleichend eingegangen werden.

### 3.5. Quantitativer Nachweis der mRNA von Kollagen Typ I und II in PCMOs durch real time RT-PCR nach Stimulation mit BMP2 und BMP7

Um die Quantität der schon mittels RT-PCR entdeckten mRNA zu bestimmen wurde die real time RT-PCR verwendet. Nach vierwöchiger Stimulation mit BMP-2 und BMP-7 zeigte sich (Abb.3.5.1) für beide Wachstumsfaktoren eine signifikante Induktion der Expression von Kollagen Typ II. Unter Stimulation mit BMP-2 zeigte sich eine 13-fache und unter Stimulation mit BMP-7 eine 8-fache verstärkte mRNA Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die Unterschiede waren signifikant wobei  $p < 0,01$ . Für Kollagen Typ I zeigte sich keine Induktion der Expression unter Stimulation mit BMP-2 und BMP-7.



**Abb. 3.5.1: Quantifizierung von A) Kollagen Typ II und B) Kollagen Typ I mRNA nach vierwöchiger Stimulation mit BMP-2 und BMP-7 im Vergleich zur Mediumkontrolle (contr.)**

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Kollagen Typ I und II Expression unter Stimulation mit beiden Wachstumsfaktoren, während die Expression von Kollagen Typ I nur minimal anstieg (\*= $p < 0,01$ )

## **4. Diskussion**

Die Gesellschaft aller Industrienationen wird immer älter, eine logische Folge ist die Zunahme des durch Fehlstellungen, Traumata und Überbeanspruchung im Alter manifest werdenden Knorpelabriebes der Gelenke. Da Knorpel die Fähigkeit des regenerativen Wachstums fehlt (Brittberg et al. 1994) und dieser nur bindegewebig ausheilt, kommt es zu einer chronischen Erkrankung des geschädigten Gelenkes, der sogenannten Arthrose. Diese äußert sich durch massive Schmerzen, Gelenkschwellungen und einer stark eingeschränkten Beweglichkeit, die eine drastische Herabsetzung der Lebensqualität mit sich bringt. Bei fast 33% der Männer und 53% der Frauen über 80 Jahre lässt sich radiologisch eine Kniegelenksarthrose nachweisen. Diese Zahlen belegen wie dringend, nicht nur symptomorientierte Therapien, wie Krankengymnastik und Medikamente, zur Schmerz und Entzündungsbekämpfung benötigt werden, sondern auch ein heilungsorientierter Ansatz für diese Erkrankung erforderlich wäre.

Bisher kann durch die konservative Therapie zwar eine Linderung der Schmerzen und eine verbesserte Beweglichkeit der Gelenke erzielt werden, allerdings wird das Fortschreiten der Erkrankung nur verlangsamt und nicht gestoppt. (Abramson et al. 1989) Dieser Grundsatz gilt auf dem Gebiet der konservativen Therapie bis heute. Eine Studie zu Interleukin 1 Antagonisten intraartikulär verabreicht muss noch abschließend beurteilt werden, wird diesen Grundsatz allerdings nicht verändern.

Schreitet die Erkrankung fort, stößt die konservative Therapie recht schnell an ihre Grenzen und kann nur noch begleitend eingesetzt werden. Die späteren Stadien der OA fordern den Einsatz operativer Maßnahmen. Die auch heute noch am häufigsten durchgeführte Operation zur Behandlung schwerer Gelenkknorpeldefekte ist der totale oder auch teil Gelenkersatz mittels Prothesen aus alloplastischen Materialien (340.000 Operationen pro Jahr). Eine Begründung für die Häufigkeit der Anwendung dieses Verfahrens ist in den vielen Vorteilen die es bietet zu suchen. Alloplastische Materialien sind zurzeit noch gut verfügbar, lassen sich in jeder Form und Größe herstellen und können individuell eingepasst werden. Auf Grund der guten

technischen Entwicklungen auf diesem Gebiet werden die Abstände in denen die Implantate ersetzt werden müssen immer länger, so dass gerade ältere Menschen die Zweit-OP kaum noch in Anspruch nehmen müssen. Die mittlere Haltbarkeit von Implantaten liegt zurzeit bei ca. 10 Jahren und mehr. Die Nachteile dieser Behandlungsmethode sind aber nicht zu vernachlässigen, da diese gerade für alte Menschen hohe Risiken bergen. Noch immer kommt es bei Gelenkersatz Operationen zu einem starken Blutverlust, der sich nicht verhindern lässt. Die Regenerationsphase ist lange und erfordert aufwändige krankengymnastische Therapie und schwere pflegerische Tätigkeit.

Eine weitere oftmals durchgeführte Operation ist die autologe Gelenkknorpel Transplantation als Teil einer osteochondralen Einheit, die besonders auf dem Gebiet der traumatisch bedingten Knorpelschäden Einsatz findet. Seit 2007 ist dieses Verfahren bei Knorpeldefekten sogar in den Leistungskatalog der Krankenkassen aufgenommen und wird z.B. von der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie; DGOOC (Behrens et al 2004) empfohlen. Die Methode ist lange erprobt und wies schon in den ersten durchgeführten Studien (ausschließlich Femurkondylen und Tibiaplateau untersucht) eine 63% Erfolgsrate nach 14 Jahren auf. (Locht et al 1984) Heute liegt die Erfolgsrate durch eine verbesserte Technik (Vorinkubation der Knorpelzellen auf einer Kollagenmatrix) bei fast 90% (Steinwachs et al 2003). Leider kann diese Methode auf Grund der fehlenden Organspender (ca. 13 pro 1 Million Einwohner pro Jahr in Deutschland) (Seiler et al 2006) nicht so häufig durchgeführt werden, wie sie benötigt würde, auch wenn die Transplantation mit eingefrorenen Transplantaten möglich zu sein scheint (Flynn et al. 1994). Der große Vorteil dieser Methode ist der Erhalt des körpereigenen Gelenkes und die kürzeren Regenerationszeiten nach Operation. Gerade für junge Menschen, die auf Grund eines Unfalles einen Gelenkknorpelschaden erleiden, ist dies eine gute Möglichkeit Folgeoperationen durch Implantatverschleiß zu vermeiden. Die Risiken dieser Methode sind, die auch für andere Transplantationseingriffe bekannten wie z.B. Infektionen, Transplantatabstoßung und die benötigte Immunsuppression.

Um das Risiko der Transplantatabstoßung und eine begleitende Immunsuppression zu vermeiden gibt es die Möglichkeit Eigengewebe zu transplantieren. Hierbei werden von unbelasteten Gelenkknorpelstellen zylinderförmige Stanzungen entnommen und direkt in die Defekte eingebracht. Eigengewebe steht jedoch nur eingeschränkt

zur Verfügung, da es zwar Knorpelflächen gibt, die durch Bewegung des Gelenkes nur leicht belastet werden, diese aber nur relativ klein sind. Zwar konnten mit der Transplantation autologer, osteochondraler Einheiten, nach Einführung der arthroskopischen Technik und deren Verfeinerung durch bessere Instrumente, gute klinische und histologische Ergebnisse erzielt werden (Bobic 1996, Hangody 1998), allerdings ist die Methode für große Knorpeldefekte ungeeignet. Ungeklärt ist noch ob die kleinen Transplantate auch langfristig in der Lage sein werden den mechanischen Belastungen im Gelenk standzuhalten und ob sie für eine dauerhafte Schmerzfreiheit sorgen können.

Die Idee Knorpeldefekte mit Periost (Afredson et al 1999) oder Perichondrium mit Anteilen der subchondralen Knochenplatte (Homminga et al. 1990, Chu et al. 1997) zu decken, entspringt dem Gedanken der rein mechanischen Entlastung des Gelenkes. Durch Schließen des Defektes und dem Wissen, dass beide Gewebe pluripotente Stammzellen enthalten (Burns et al.1997), die in der Lage sind sich zu Chondrozyten zu differenzieren, kann dieses Ziel erreicht werden. Nachteile dieser Methode sind, dass sich mit zunehmendem Alter und Abnahme der vorhandenen Stammzellen die Erfolgsaussichten reduzieren und die Gefahr einer Ossifikation besteht, welche den Knorpelschaden im schlimmsten Fall sogar vergrößern könnte.

Trotzdem wurden die Methode der Periosttransplantation und die damit verbundenen Möglichkeiten weiterverfolgt. In Kombination mit autologer Chondrozytentransplantation (ACT) konnte sie mit guten Ergebnissen angewendet werden.

Bei der kombinierten Methode werden die Knorpeldefekte mit Periost bedeckt und Chondrozyten unter das Periost, direkt in den Defekt gespritzt (Bittberg 1994). Es kam zu einer Neubildung von hyalin-artigem Knorpel mit vollständiger Defektdeckung. Dies konnte klinisch und histologisch nachgewiesen werden (Peterson 1998, Richardson et al. 1999). Auch weitere Arbeiten konnten je nach Lokalisation bei dieser Methode eine bis zu 90%-ige Erfolgsquote nach zehn Jahren nachweisen (Erggelet et al. 1998, Loehnert et al. 1999). Aber auch bei dieser Methode bleibt das Problem der limitierten Verfügbarkeit des Materials bestehen.

Nach all diesen Versuchen, eine optimale operative Therapie zum Gelenkknorpelersatz zu finden, muss man sich bisher eingestehen, zwar relativ gut funktionierenden, aber doch stark problembehaftete Methoden gefunden zu haben, um die Volkskrankheit Arthrose zu therapieren .

Neuere Ansätze der Therapie verlassen daher die Pfade des Althergebrachten und wenden sich dem Gedanken des Tissue Engineering zu. Der Grundgedanke ist auch hierbei, die Implantation von Chondrozyten, welche eine Regeneration des Gewebes in vivo bewirken, so dass auf Gewebstransplantationen verzichtet werden kann.

Stellt man sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt seiner Entwicklung der Mensch noch fähig ist alle Gewebetypen die es im Körper gibt, selber neu zu bilden, muss man zwangsläufig an den Beginn seiner Entstehung zurück gehen. Die Embryonalphase ist die Phase unseres Lebens, in der wir in der Lage sind aus nur wenigen Zellen eine Vielfalt an Geweben entstehen zu lassen. Genau an diesen pluripotenten embryonalen Stammzellen entsprang der Gedanke des Tissue Engineering.

Erste Versuche mit embryonalen Stammzellen der Maus erbrachten gute Erfolge. Die aus Blastozysten entnommenen Zellen der Mäuse konnten nicht nur zu Insulin produzierenden Zellen differenziert werden und in insulindefiziente Mäuse reimplantiert werden (Soria 2000), sondern auch eine Differenzierung zu Herzmuskelzellen (Edwards et al. 1983), Neuronen, Astroglia (Edwards et al. 1983), sowie zu Chondrozyten (Bruder et al. 1994) gezeigt werden.

Versuche mit menschlichen embryonalen Stammzellen sind in Deutschland jedoch auf Grund der Gesetzeslage von 1992 nicht durchführbar, obwohl technisch unproblematisch und an Tieren bereits vielfältig erprobt, überwiegt die Angst vor den womöglich ethischen Konsequenzen, die großartige Möglichkeit des medizinischen Fortschrittes.

Die ersten menschlichen embryonalen Stammzellen konnten bereits vor zehn Jahren erfolgreich kultiviert werden (Thomsen et al. 1998). Alle embryonalen Stammzelllinien haben das Potential sich zu Teratomen zu entwickeln, sie müssten also vor Implantation einer Veränderung des biologischen Programms in vivo unterzogen werden, um dies zu verhindern. Die Veränderung des biologischen Programms der Zellen ist z.B. durch vorherige Differenzierung zu erreichen. Dies konnte bereits mehrfach an Mäusen gezeigt werden, wie in der oben schon zitierten Arbeit von (Soria 2000) und in der Arbeit von (Kim et al. 2002) dargestellt.

Auf Grund der ethischen Kontroverse hat die Wissenschaft sich einer anderen Zelllinie mit pluripotentem Potential zugewandt. Um die Idee des Tissue Engineering weiter zu verfolgen, wurden adulte Stammzellen aus Geweben wie Haut, Knochenmark, Leber, Blut, Knochen und Knorpel isoliert. Diese Zellen liegen in den verschiedenen differenzierten Geweben Zeit Lebens vor. Diese Zellen liegen in den

verschieden differenzierten Geweben Zeit Lebens vor und haben auf Grund ihrer hohen Plastizität eine hohe Ähnlichkeit mit embryonalen Stammzellen. Sie bieten daher auch ähnliche Möglichkeiten.

Anders als embryonale Stammzellen unterliegen die keinen juristischen oder ethischen Begrenzungen. Sie stehen in relative großer Zahl, auch wenn diese im Alter abnimmt, zur Verfügung und können meist ohne größeren Aufwand gewonnen werden.

Die meisten Erfahrungen hat man mit hämatopoietischen Stammzellen (HSC) und mesenchymalen Stammzellen (MSC), die beide aus dem Knochenmark gewonnen werden. Mesenchymale Stammzellen wurden zum ersten Mal von (Haynesworth et al. 1992) beschrieben. Danach konnten MSC zu vielen andern Zelllinien differenziert werden (u.a. zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten). MSC, die Mäusen direkt in den Herzmuskel injiziert wurden, waren in der Lage sich in Herzmuskelzellen zu differenzieren. Auch Patienten mit Osteogenesis imperfecta konnte durch die Injektion von Knochenmark geholfen werden. Es konnte ein guter therapeutischer Effekt nachgewiesen werden (Pittenger et al 2002)

Alle mesenchymalen Stammzellen zeigten nach Isolation einen stabilen Phenotyp in vitro. Es konnten sogar Zellen identifiziert werden die sich selbst nach Wachstum in Kolonien nicht zu Progenitorzellen umwandelten, sondern ihre Potenz zur Differenzierung in verschiedene Gewebe beibehielten. (Pittenger et al. 1999)

Die MSC können sich zwar zu verschiedenen Zellen differenzieren, benötigen hierfür aber auch die entsprechenden Stimuli. Für die Chondrogenese konnte TGF- $\beta$  als einer der wichtigen Stimuli identifiziert werden (Johnstone et al. 1998 und Mackay et al. 1998). Es zeigte sich nach Stimulation das Vorhandensein von Kollagen Typ II und Glucosaminoglycanen. Wichtig zu wissen ist, dass auch die biomechanischen Eigenschaften des neugebildeten Knorpel, dem von nativen Knorpelgewebe entsprach. Dies muss jedoch histologisch und biomechanisch immer neu getestet werden. Leider zeigt Knorpel der aus MSC gewonnen wurde die Tendenz zu hypertrophieren und zu kalzifizieren (Johnstone et al. 1998). Aus diesem Grund werden derzeit Knorpelzellen aus organotypischen Biopsien gewonnen, diese werden dann ohne Vermehrung als primäre Chondrozytenkulturen in vitro eingesetzt (Klemt 1998), oder in dreidimensionalen Medien gezüchtet (Domm et al. 2000). Hierdurch würden Gelenkrekonstruktionen theoretisch möglich, ohne dass Teile des Knochens entfernt, oder Fremdkörper als Ersatz eingebracht werden müssten. Die

Methode ist außerdem äußerst verträglich, da körpereigene Zellen benutzt werden. Es kann zu keiner Abstoßungsreaktion kommen und Immunsuppression ist deswegen nicht notwendig. Das Setzen eines Knorpelschadens an anderer Stelle, wie z.B. bei den oben benannten Mosaikplastiken würde entfällt.

Genügend Nachteile bringt aber auch diese Methode mit sich. Der erste und offenkundigste ist wohl der, dass zwei invasive Eingriffe notwendig sind. Zuerst muss dem Patienten das Knochenmark aus Sternum oder Beckenkamm entnommen werden, um hieraus die MSC zu isolieren, zu kultivieren und dann in einem zweiten Eingriff in den Knorpeldefekt einzubringen. Leider konnten MSC bisher auch nur bei unter 50 jährigen Patienten isoliert werden (Schöler 2003). Ursachen hierfür werden im Alterungsprozess des Menschen vermutet, denn je älter wir werden umso weniger sind wir auch in der Lage unsere Gewebe zu erneuern (Geiger et al. 2002). Da die Arthrose aber in besonderem Maße ein Problem für Patienten über 50 darstellt, schließt diese Therapie, die Patienten aus, die am meisten von ihr profitieren würden. Adulte Stammzellen werden jedoch nicht nur im Knochenmark gefunden, sondern sind auch Bestandteil des peripheren Blutes. Diese können ganz einfach durch eine intravenöse Punktion ohne große invasive Eingriffe in hoher Zahl gewonnen werden. Bei einer Venenpunktion fallen viele der Risiken einer Knochenmarkspunktion, wie die Verletzung umliegender Organe, die Punktion großer Gefäße oder eine allergische Reaktion auf das Betäubungsmittel weg. Die Venenpunktion ist also für den Patienten weit weniger invasiv und belastend. Wäre die Isolation von pluripotenten Stammzellen auf diese Weise möglich, hätte man einen wichtigen Schritt zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien der OA getan.

Ein von Rhunke et al. 2005 durchgeführte Studie konnte zeigen, dass monozytäre Zellen (PCMOs) des peripheren Blutes nach sechstägiger Dedifferenzierung in vitro mit Makrophagen colony stimulating factor (M-CSF) und Interleukin 3 (IL-3) das Potential zur Differenzierung in verschiedene Gewebe besitzen, wie z.B. Hepatozyten und Insulin produzierende Zellen.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden PCMOs mit BMP2 und BMP7 über mehrere Wochen stimuliert, worauf hin diese auch nach 6 Wochen noch Kollagen Typ II produzierten. Auch mikroskopisch und elektronenmikroskopisch konnte eine Veränderung der Morphologie in Richtung Chondrozyten gezeigt werden. Zur Analyse der Kollagenproduktion wurden sowohl Immunhistochemie als auch zur

quantitativen Messung der Kollagen Typ II Konzentration ein ELISA, sowie zum qualitativen Nachweis RT-PCR durchgeführt.

Bisher gibt es keinerlei Studien an anderen pluripotenten Zellen des peripheren Blutes, die die Differenzierung zu Knorpelzellen, durch Stimulation mit BMP-2 und -7 erforscht. Lediglich eine Arbeit erschien 2003 (Kuwana et al.), die eine dreiwöchige Produktion von Kollagen Typ II unter Stimulation mit TGF $\beta$ 1 bei CD14+ Monozyten nachweisen konnte. Über einen längeren Zeitraum der Stimulation als drei Wochen konnte jedoch kein Kollagen Typ II mehr nachgewiesen werden.

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass PCMOs unter Stimulation mit BMP-7 und BMP-2 die Produktion von Kollagen Typ II nicht nach 3 Wochen einstellen, sondern diese auch über einen Zeitraum von 6 Wochen beibehalten. In der parallel durchgeführten Arbeit zur Stimulation von PMCOs mit TGF $\beta$ 1 und IGF-1 konnte dies ebenfalls gezeigt werden.

Während der ganzen Stimulationsphase von 6 Wochen verloren die PCMOs den Stammzellmarker CD14 nicht. Sie behielten also einen Marker für Pluripotenz. Ob sich PCMOs nach Differenzierung plus Stimulation wieder dedifferenzieren können wurde nicht untersucht. Auch nicht ob sie sich durch Stimulation mit anderen Wachstumsfaktoren aus chondrozytären Zellen zu wieder anderen Zelltypen differenzieren können. Die Zellen wurden nach Ende der Stimulationszeit nicht weiter beobachtet.

Unter der Stimulation mit BMP-2 zeigte sich sowohl eine morphologische, elektronenmikroskopisch nachweisbare Veränderung von einer monozytären zu einer chondrozytären Zelle, als auch nach 2 Wochen Stimulation immunhistochemisch, im ELISA und in der PCR ein signifikant positiver Nachweis von Kollagen Typ II.

Für BMP-7 dagegen ließ sich zwar ein positiver Nachweis der morphologischen Veränderung und auch ein Nachweis von Kollagen Typ II mittels Immunhistochemie erbringen, allerdings zeigte sich im ELISA nur ein vernachlässigbar geringer Anstieg (nicht signifikant) der Kollagen Typ II Konzentration im Vergleich zur Mediumkontrolle. Sowohl immunhistochemisch als auch in der RT-PCR konnte kein Verschwinden der Produktion von Kollagen Typ I nachgewiesen werden.

Wurden jedoch BMP-2 und BMP-7 in Kombination zur Stimulation der Zellen benutzt zeigte sich ein deutlich synergistischer Effekt auf die Kollagen Typ II Sekretion im ELISA. Die gemessene Kollagen Typ II Konzentration hatte sich im Vergleich zur singulären Stimulation mit BMP-2 verdoppelt.

Alle Mediumkontrollen zeigten weder eine morphologische Veränderung noch eine Produktion von Kollagen Typ I und II.

Die im Rahmen dieser Studie ebenfalls untersuchten Effekte der Wachstumsfaktoren TGF $\beta$ -1 und IGF-1, wurden in einer zweiten Arbeit detailliert untersucht (Pufe et al. 2008). Es konnte hier durch Analyse Mittels Immunhistochemie, Elektronmikroskopie, und PCR ganz ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Allerdings konnte, anders als unter Stimulation mit BMP-2, unter Stimulation mit TGF- $\beta$  und IGF-1 in der RT-PCR kein Nachweis des für Knorpel minderwertigen Kollagen Typ I erbracht werden. Im ELISA zeigten sich deutlich höhere Konzentrationen von Kollagen Typ II durch Stimulation mit TGF- $\beta$  und IGF1, als durch Stimulation mit BMP-2. Für IGF-1 lag die mittels ELISA gemessene Konzentration (217 $\pm$ 15 pg/ml) nach 4 Wochen um 33% höher als nach vierwöchiger Stimulation mit BMP-2 (163 $\pm$ 11 pg/ml). Für TGF $\beta$  lag die mittels ELISA gemessene Konzentration (406 $\pm$ 28 pg/ml) sogar um 149% höher als nach Stimulation mit BMP-2 (163 $\pm$ 11 pg/ml).

Die kombinierte Stimulation mit IGF-1 und TGF $\beta$ -1 (670 $\pm$ 46 pg/ml) zeigte im Vergleich zur Kombination von BMP-2 und BMP-7 (347 pg/ml) eine doppelt so hohe Konzentration von Kollagen Typ II.

Direkt vergleichende Arbeiten hinsichtlich des Stimulationspotentials bei MSC von BMP-2, BMP-7, TGF $\beta$ -1 und IGF-1 gibt es nicht. Vergleicht man jedoch die einzelnen Arbeiten und Zahlen wird in vielen Arbeiten als effektivster Stimulator zur Chondrogeneseeinleitung bei MSC TGF $\beta$ -1 beschrieben (Johnstone et al. 1998), während die Stimulation mit IGF-1 eher zu einer deutlichen Proliferation der Zellen führte. Viele Arbeiten haben sich mit der Rolle dieser beiden Wachstumsfaktoren beschäftigt (z.B. Worster et al. 2001, Fortier et al. 1996). TGF $\beta$ -1 scheint nach allen bisherigen Ergebnissen dabei der Faktor zu sein der die Transformation der Zellen zu Chondrozyten einleitet allerdings die Proliferation der Zellen unterdrückt. Um diesen Schritt zu vollziehen, wird unter anderem IGF-1 benötigt. Das Ergebnis der Stimulationen der PCMOs konnte genau das zeigen. TGF- $\beta$  führte in einem größeren Maße zur Transformation der Zellen als IGF-1 alleine und damit zur Kollagen Typ II Produktion. Beide in Kombination schafften die Möglichkeit der Transformation und Proliferation der Zellen, wodurch sich die Verdopplung der Kollagen Typ II Synthese erklären könnte.

Bei der Stimulation der PCMOs mit BMP-2 und BMP-7 wurde ausschließlich mit diesen Wachstumsfaktoren stimuliert und keine Vorstimulation der Zellen mit TGF $\beta$ -1

durchgeführt, aber gerade dieser Schritt bzw. dieser Faktor ist auch für die Chondrogenese initial äußerst wichtig. Es verwundert also nicht, dass unter alleiniger Stimulation mit BMP-2 und BMP-7 keine genau so hohe Induktion der Kollagensynthese stattgefunden hat, wie durch die Stimulation mit TGF $\beta$ -1 und IGF-1. Vielmehr ist das Bemerkenswerte, dass eine signifikant nachweisbare Transformation der Zellen zu chondrozytären Zellen auch ohne die Anwesenheit von TGF $\beta$ -1 stattfindet, sogar in Monolayerkultur. Für MSC und in vivo konnte die Wichtigkeit der Zelladhäsion für die Chondrogenese in vielen Arbeiten gezeigt werden (z.B. Ede 1983, San Antonio et al. 1986, 1987, 1992).

BMPs scheinen also in der Chondrogenese von PCMOs eine bedeutende Rolle zu spielen, nur scheint ihre Aufgabe nicht die der initialen Transformation und Proliferation zu sein. Genau dies ist auch für MSC und Chondrozyten selber schon lange bekannt. In der menschlichen Chondrogenese erhöhen BMPs die Proliferationsrate von Chondrozyten verzögern aber die terminale Transformation. Chondrozyten oder deren Vorläufer sezernieren BMP-2 und BMP-7 auch nur bei bestehender Adhärenz und Wachstum der Zellen (Hall und Miyaake 2000).

BMP-2 scheint für PCMOs der potentere Stimulator zur Induktion der Kollagen Typ II Synthese zu sein. Allerdings konnte in der RT-PCR auch die Produktion von Kollagen Typ I nachgewiesen werden, jedoch in geringerem Maße. Da BMP-2 insbesondere für die Osteogenese eine wichtige Rolle spielt, ist dieser Nachweis nicht verwunderlich. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch der Nachweis von Kollagen Typ X als Marker für den Prozess der Kalzifizierung. Für MSC wurde in Monolayer Kultur, unter Stimulation mit BMP-2, eher eine Differenzierung zu Osteo- und Adipozyten gezeigt (z.B.: Ahrens et al. 1993, Gazit et al. 1993). Chondrogenese dagegen konnte nur in Mikromassen Kulturen, unter Stimulation von BMP-2 nachgewiesen werden (Ahrens et al. 1993, Andrew et al. 2000). Auch dies lässt vermuten, dass die Zelladhäsion für die Chondrogenese einen wichtigen Faktor darstellt.

Da BMP-2 also ein Wachstumsfaktor ist, der zur Transformation von Stammzellen in mehrere Zelltypen geeignet ist, stellt er keinen guten singulären Stimulator für die Chondrogenese da. Er spielt in ihr zwar eine wichtige Rolle, sollte aber eher in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren und in 3D Matrix zur Chondrogeneseinduktion bei PCMOs angewandt werden. Dies ist besonders

interessant im Hinblick auf den synergistischen Effekt von BMP-2 und BMP-7 der sich in dieser Untersuchung zeigte.

BMP-7 gilt in der bisherigen Literatur als Induktor für die Bildung von Knorpel und Knochen in der embryonalen Entwicklung (Celeste et al. 1990), sowie als Induktor für Reparaturmechanismen von Knochen und Knorpel (Krebsbach et al. 2000, Mason et al. 1998, 40). BMP-7 verstärkt außerdem die Bildung von Extrazellulärmatrix ohne eine Hypertrophie (Stöve et al. 2006) oder Expression von Kollagen Typ X der Zellen zu bewirken (Chen et al. 1993). Einige dieser Arbeiten beschäftigen sich vorwiegend mit gentechnisch modifizierten MSC oder Chondrozyten, die mittels Vektortechnik verstärkt BMP-7 produzierten. Es zeigte sich eine eindeutig gesteigerte Gewebsproduktion, bei den gentechnisch veränderten Chondrozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. BMP-7 scheint also eine wichtige Rolle in der Gewebsbildung zu spielen und zusätzlich einen proliferativen Effekt zu haben. Als alleiniger Stimulus in einer Monolayerkultur von PCMOs, die sich erst noch differenzieren müssen, spielt BMP-7 also eher eine untergeordnete Rolle. In Kombination mit BMP-2 kann es aber synergistisch, oder auch nach Differenzierung appliziert, proliferativ wirken. Dies entspricht den bisher in der Literatur gezeigten Daten. BMP-7 ist daher im Rahmen des Tissue Engineering für Knorpel ein extrem wichtiger Wachstumsfaktor, gerade wegen seines Potentials eine Reparatur des Knorpels einzuleiten. Darüber, ob BMP-7 jemals therapeutisch zur Knorpelregeneration eingesetzt wurde, liegen bisher keine Daten vor.

Kritisch anzumerken zu allen bei den Untersuchungen gefundenen synergistischen Effekten bei kombinierter Stimulation mit zwei Wachstumsfaktoren ist die schlechte Aussagekraft über die genauen Einzeleffekte. Solche Kombinationen werfen immer die Frage auf, ob sich die Wachstumsfaktoren auch gegenseitig beeinflussen, ob sie sich gegenseitig verändern oder sogar ganz andere Reaktionskaskaden in Gang setzen, als ein Wachstumsfaktor alleine. Es ist allerdings zu bedenken, dass auch im Körper immer eine Kombination von Signalen bestimmte Reaktionen nach sich zieht. Um jedoch genaue Aussagen über die ablaufenden Reaktionen nach Stimulation mit einem Wachstumsfaktor zu erhalten, sind Einzelstimulationen unverzichtbar.

Ein erst kürzlich erschienener Artikel zeigt allerdings gut, welches Potential Wachstumsfaktorkombinationen haben können. In dieser Arbeit konnten unter Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 und BMP-7 eine Induktion der Chondrogenese und die

Synthese von superficial zone protein von mesenchymalen progenitor Zellen des infrapatellaren Fettpolsters beobachtet werden (Lee et al. 2008). Eine weitere Arbeit konnte dies auch für synoviale Zellen zeigen (Yamane et al. 2008) Eine andere Arbeit zeigt dies aber auch für synoviale, mesenchymale Zellen (Miyamoto et al. 2007).

Es bleiben noch viele Fragen offen: Welche Konzentrationen der Wachstumsfaktoren führen zur stärksten morphologischen Veränderung und Induktion der Kollagen Typ II Synthese? Wie wachsen PCMOs in einer 3D Matrix und wie verhalten sie sich in dieser unter Stimulation? Wie reagieren PMCOs auf eine Vorinkubation mit TGF $\beta$ -1 und nachfolgender Stimulation der andern Wachstumsfaktoren?

Bis zur klinischen Anwendung der Methode des Tissue Engineering werden also noch einige Jahre bis zum Abschluss der Forschung vergehen. Innovative Verfahren zur Behandlung der OA werden dringend benötigt, da in den kommenden Jahren eher mehr als weniger Patienten von dieser Erkrankung betroffen sein werden.

Die Gewinnung der PMCOs wäre einfach und insbesondere einfacher als die Gewinnung von MSC. Beide Zelllinien scheinen ein ähnliches Potential zur Chondrogenese zu besitzen, nur dass dieses bei PCMOs noch nicht abschließend untersucht ist, wie bei den verwandten MSC. In vivo Untersuchungen auf dem Gebiet der Chondrogenese mit PMCOs sollten folgen. Eine Studie zur Frakturheilung im Rattenfemur unter Therapie mit PCMOs wurde bereits durchgeführt (Finn et al.). Eine Studie zum Einsatz bei Gelenkknorpelschaden müsste folgen. Von der direkten Anwendung im menschlichen Gelenkknorpel sind PCMOs jedoch noch weit entfernt. Eine weitere kritische Bemerkung gilt den Spendern der PCMOs. Es ist festzuhalten, dass alle Spender unter 65 Jahre alt waren und vor der Kultivierung meistens die Zellen von 2-4 Spendern gepoolt wurden. Bei kommenden Untersuchungen sollte dies unbedingt vermieden werden und auch Raucher und Alkoholiker nicht als Spender in Betracht kommen, um hier eine Standardisierung zu erreichen. Wichtige Essenz ist jedoch dass PCMOs auch von Patienten über 50 Jahren in ausreichender Zahl gewonnen werden konnten, ganz anders als bei MSCs. Ob diese jedoch das gleiche Potential zur Differenzierung aufweisen wie die Zellen jüngerer Spender bleibt zu überprüfen.

## **5. Zusammenfassung**

Degenerative Veränderungen in menschlichen Gelenken sind häufig (Osteoarthritis, OA) und stellen für die Betroffenen eine starke Einschränkung der Lebensqualität dar. Im Vordergrund stehen hierbei starke Schmerzen und die Bewegungseinschränkung durch die Erkrankung. Bei einer Defektgröße kleiner 6 cm<sup>2</sup> kann heute auf das Verfahren der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) zurückgegriffen werden. Bei größeren Defekten und chronischen Beschwerden muss auch heute noch das Gelenk endoprothetisch ersetzt werden. Die heute verwendeten Prothesen sind in Qualität und Anpassungsfähigkeit verbessert worden; derzeit gibt es jedoch keine Möglichkeit OA ursächlich zu heilen. Aus diesem Grund werden neue Verfahren benötigt, wenn das ehrgeizige Ziel erreicht werden soll, OA nicht nur symptomorientiert zu behandeln.

Eine dieser neuen Methoden könnte die in dieser Arbeit vorgestellte sein. Ähnlich wie bei der ACT wird im vorgestellten Verfahren aus körpereigenen Stammzellen Knorpelgewebe bzw. Knorpelzellen gezüchtet, das direkt in den Knorpeldefekt eingebracht werden kann, um eine Regeneration des Knorpels zu erreichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden monozytäre Stammzellen des peripheren Blutes isoliert und dedifferenziert. Unter Stimulation mit den Wachstumsfaktoren Bone morphogenetic protein BMP-2 und BMP-7 und deren Kombination konnte eine morphologische Transformation zu chondrozytären Zellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden. Kollagen Typ II Synthese konnte nur durch Stimulation mit BMP-2 und der kombinierten Stimulation von BMP-2 und BMP-7, im ELISA und mittels RT-PCR nachgewiesen werden. In der Immunhistochemie fand sich eine positive Kollagen Typ II Färbung nach Stimulation mit allen Wachstumsfaktoren. Nach Stimulation mit BMP-2 lies sich auch nach vierwöchiger Stimulation noch der Nachweis von Kollagen Typ I erbringen, das im Laufe der Stimulation bei allen anderen Wachstumsfaktoren nicht mehr nachzuweisen war.

Die publizierten Daten für mesenchymale, aus dem Knochenmark gewonnene Stammzellen (MSC), zeigten ein gutes Potential zur chondrozytären Differenzierung und wurden bereits im Tiermodell in vivo getestet. Das große Problem dieser

Stammzellen ist jedoch ihre geringe Verfügbarkeit, da ein invasiver Eingriff (Knochenmarkspunktion) zur Gewinnung notwendig ist und sie bei Menschen über 50 Jahren nicht mehr isoliert werden können. Zur therapeutischen Anwendung würden sie in Massen benötigt werden, um Effekte zu erzielen.

PCMOs, die unter ähnlichen Bedingungen kultiviert wurden wie MSCs, zeigen in dieser Arbeit sehr ähnliche Ergebnisse. BMP-2 und BMP-7 sind in der Chondrogenese wichtige Wachstumsfaktoren, die auch in der chondrozytären Differenzierung von PCMOs eine Rolle zu spielen scheinen. Ihre Bedeutung für die initiale Transformation der PCMOs in Monolayer Kultur ist aus den erhobenen Daten als eher geringfügig zu bewerten. BMP-7 übt nach den hier erhobenen Daten den geringsten Reiz auf die chondrozytäre Differenzierung von PCMOs aus. BMP-2 und BMP-7 könnten jedoch stärkere stimulatorische Effekte in einem dreidimensionalen Kulturmodell erzielen. In der Literatur finden sich viele Hinweise, dass BMP-2 und BMP-7 gerade in Kombination mit einer erhöhten Zelladhärenz (3D-Kulturmodell), die ein wichtiger Faktor in der Chondrogenese ist, ihre höchsten stimulatorischen Effekte erzielen. BMP-7, als wichtiger Induktor der Reparatur von Knorpel und Knochen, sollte im Hinblick auf die spätere ggf. mögliche klinische Anwendung nicht aus den Augen verloren werden. Beide Wachstumsfaktoren sind in der Literatur durch Steigerung der Zellproliferation und Produktion von Extrazellulär Matrix als besonders potente Stimulatoren der Gewebeneubildung bekannt. BMP-2 und -7 werden nach den bisherigen Ergebnissen, wohl eher eine Rolle in der 3D Kultur und in der späteren Gewebsbildung spielen, als für die initiale Transformation der Zellen. Diese Arbeit konnte das Potential der PCMOs zur chondrozytären Differenzierung zeigen und eröffnet eine neue Perspektive des Tissue Engineerings. Weitere wichtige Untersuchungen müssen allerdings folgen, um eine endgültige Aussage treffen zu können. Eine Untersuchung zur Analyse von PCMOs in einer dreidimensionalen Matrix ist bereits geplant. Aufgrund der anhaltenden Kollagen Typ I Produktion der Zellen sollte ebenfalls über eine Modifizierung des Wachstumsfaktorcocktails nachgedacht werden. Sollte sich dieses Modell über kurz oder lang auch in vivo bewähren, könnte es Anwendung in der Therapie von OA und traumatisch bedingten Knorpelschäden finden und damit vielleicht ein weniger invasiver, wenn nicht vielleicht sogar kurativer Therapieansatz gefunden sein.

## 6. Literaturverzeichnis

Abramson S B, Weissmann G, *The mechanism of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs*, Arthritis Rheumat (1989) 32: 1-9

Ahrens M, Ankebauer T, Schröder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G, *Expression of human bone morphogenetic protein-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages* (1993) DNA Cell Biol 12:871-880

Alfredson H, Thorsen K, Lorentzon R, *Treatment of tear of the anterior cruciate ligament with localized deep cartilage defects in the knee with ligament reconstruction and autologous periosteum transplantation* (1999) Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc; 7(2):69-74

Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Löhnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer J, Nehrer S, Niethard FU, Nöth U, Perka C, Richter W, Schäfer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K, *Indications and implementation of recommendations of the working group "Tissue Regeneration and Tissue Substitutes" for autologous chondrocyte transplantation (ACT)* (2004). In: Z Orthop Ihre Grenzge. 142: 529-539.

Bellamy N, Kriwan J, Boers M, Brooks P, Strand V, Tugwell P, Altman R, Brandt K, Dougados M, Lequesene M, *Recommendations for a core set of outcome measures for future phase II clinical trials in knee, hip and hand osteoarthritis* (1997) Consensus development at OMERACT III. J Rheumatol Apr; 24 (4): 799-802

Bobic V, *Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament* (1996) Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc; 3:262-26

Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L, *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation* (1994) *N Engl J Med*; 331(14):889-895

Bruder S P, Fink D J, Caplan A I, *Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair and skeletal regeneration therapy* (1994) *Journal of Cell Biochemistry* 56:283-287

Buckwalter JA, Mankin HJ, *Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions* (1998) *Instr Course Lect* , 47: 477-86

Buckwalter JA, Mankin HJ, *Articular Cartilage - Part I.* (1997) *J Bone Joint Surg* 79-A: 600-611

Burns J, Behrens P, Silbermann M, *Das Prinzip der Transplantation autogenen Rippenperichondriums zur Behandlung von tiefen Gelenkknorpeldefekten* (1997) *Z Orthop* 135: 138-144

Celeste A J, Iannazzi J A, Taylor R C, Hewick R M, Rosen V, Wang E A, Wozney J M, *Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone* (1990) *Proc Natl Acad Sci* 87:9843-9847

Chen D, Zhao M, Mundy G R, *Bone Morphogenetic Proteins* (2004) *Growth Factors* 22 (4):233-241

Chen P, Vukicevic S, Sampath T K, Luyten F P, *Bovine articular chondrocytes do not undergo hypertrophy when cultured in presence of serum and osteogenic protein-1* (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 197:1235-1239

Chu R C, Douchis J S, Yoshioka M, *Osteochondral repair using perichondral cells* (1997) *Clin Ortop* 340:220-229

Cicutini FM, Spector TD, *The genetics of osteoarthritis* (1996) *J Clin Pathol.* Aug; 49 (8): 617-618

Domm C, Fay J, Schünke M, Kurz B, *Die Redifferenzierung von differenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur* (2000) Orthopäde 29:91

Denker A E, Andrew R H, Nicoll S B, Tuan R S, *Chondrogenetic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: 1. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density cultures* (1998) Differentiation 64:67-76

Ede D A, *Cellular condensations and chondrogenesis in: Hall BK (ed) cartilage: Development, differentiation and growth* (1983) Academic press, NY, Vol2:143-185

Edwards M K S, McBurney M W, *The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell type formed by a teratocarcinoma cell line* (1983) Dev Biol 98:187-1991

Erggelet C, Mandelbaum B, Lahm A, *Der Knorpelschaden als therapeutische Aufgabe: Klinische Grundlagen* (2000) deutsche Zeitung für Sportmedizin 51 (2):48-59

Erggelet C, Steinwachs M, *Autologous chondrocyte transplantation: Chondrocyte culturing and clinical aspects* (1998) in: Strak GB, Horch R, Tanczos E (Eds): Biological matrices and tissue reconstruction. Springer Verlag Heidelberg New York Tokio 189-193

Finn J, Schulze M, Pufe T, Hansen U, Faendrich F, Petersen W, *Injizierte mesenchymale Stammzellen differenzieren zu Chondrocyten im Milieu des Frakturkallus und in Knochendefekten* (2003) Z Orthop **141**:129-130

Flynn J M, Dempsey S, Springfield, Mankin H J, *Osteoarticular allografts to treat distal femoral osteonecrosis* (1994) Clin Orthop 303:38-43

Fronier L A, Cable C S, Nixon A J, *Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells in long-term three-dimensional fibrin cultures treated with IGF-1* (1996) Trans, 42<sup>nd</sup> Ann Mtg ORS 21:110

Gazit D, Ebner R, Kahn A J, Derynck R, *Modulation of the expression of cell-surface binding of members of the transforming growth-factor- $\beta$  superfamily during retinoic acid-induced osteoblastic differentiation of multipotential mesenchymal cells* (1993) Mol Endocrinol 7:189-198

Geiger H, Van Zant G, *The aging of lymphohematopoietic stem cells* (2002) Nat Immunol 3: 329-333

Hangody L, *Mosaicplasty in the treatment of focal chondral and osteochondral defects* (1998) ICRS Newsletter 1, 11

Hauselmann HJ, Flura T, Marti C, Hauser N, Hedborn E, *From chondrocyte culture to joint cartilage replacement. Development of de novo cartilage* (1998) Schweiz Med Wochenschr 128: 824-832

Hidaka C, Quitoriano M, Warren R, Crystal R, *Enhanced matrix synthesis and in vitro formation of cartilage-like tissue by genetically modified chondrocytes expressing BMP-7* (2001) Journal of orthopaedic research 19:751-758

Hommings G N, Bulstra S K, Bouwmeester PSM, Van der Linden A J, *Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee* (1990) J Bone Joint Surg 72-B: 1003-1007

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU, *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells* (1998) Exp Cell Res, Jan 10; 238(1):265-272

Junqueira LC, Canerio J, Schiebler TH, *Histologie* (1996), Springer Verlag, 4. Auflage

Krebsbach P H, Gu K, Franceschi R T, Rutherford R B, *Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts from bone in vivo* (2000) Hum Gene Ther 11:1201-1210

Kim J H, Auerbach J M, Rodriguez-Gomez J A, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee S H, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R, *Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease* (2002) *Nature* 418:50-56

Klemt C, *Tissue engineered cartilage with cultured chondrocytes and a collagen sponge matrix* (1998) Stark G B, Horch R, Tanczos E (eds) *Biological matrices and tissue reconstruction*, Springer, Berlin Heidelberg NY, p 169

Knutson K, Lindstrand A, Lidgren L, *Survival of knee arthroplasties. A nation-wide multicentre investigation of 8000 cases* (1986), *J Bone Joint Surg. Br.* Nov; 68 (5): 795-803

Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Izumi K, Yasuoka H, Ogawa Y, Kawakami Y, Ikeda Y et al. *Human circulation CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation* (2003) *J of Leukoc Biol* 74(5):833-845

Lee S Y, Nakagawa T, Hari Reddi A, *Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein (SZP)/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of knee joint treated with TGF $\beta$ -1 and BMP-7* (2008) *BBRC* 376:148-153

Locht R C, Gross A E, Langer F, *Late osteochondral allograft resurfacing for tibial plateau fractures* (1984) *J Bone Joint Surg* 66-A:328-335

Loehnert J, Ruhnau K, Gossen A, Wiese M, *Autologe Chondrozytentransplantation (ACT) im Kniegelenk* (1998) *Arthroskopie* 12:34-42

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

Miyamoto C, Matsumoto T, Sakimura K, Shindo H, *Osteogenetic protein 1 with transforming growth factor-beta1: Potent inducer of chondrogenesis of synovial mesenchymal stem cells in vitro* (2007) J Orthop Sci. 12: 555-561

Narmoneva DA, Wang JY, Setton LA, *A noncontacting of material property determination for articular cartilage from osmotic loading* (2001) Biophys J. Dec; 81 (6): 3066-76

Niethard FU, Pfeil J, *Orthopädie* (2003), Duale Reihe 4. Auflage

Peterson L, *Autologous chondrocyte transplantation: 2-10 year follow up in 219 patients* (1998) AAOS 65<sup>th</sup> annual meeting New Orleans

Pittenger M F, Flake A M, Deans R J, *Stem cell culture: Mesenchymal stem cells from bone marrow* (2002) Methods of tissue engineering 38:461-467

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cellc* (1999) Sience 284(5411):143-147

Pufe T, Petersen W, Fändrich F, Varoga D, Wruck C J, Mentlein R, Helfenstein A, Hoseas D, Dressel S, Tillmann B, Ruhnke M, *Programmable cells of monocytic origin (PMCO): A source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes* (2008) Journal of orthopaedic research 26(3):304-313

Pullig O, Pfander D, Swoboda B, *Molecular principles of induction and progression of arthrosis* (2001) Orthopaede. Nov; 30 (11): 825-33

Quarz M, *Gelenkendoprothesen bei Arthrose bzw. rheumatoider Arthritis* (2010)  
www.rheuma-liga.de

Richardson J B, Caterson B, Evans E H, Ashton B A, Roberts S, *Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes* (1999) *J Bone Joint Surg* 81-B:1064-1068

Ruhnke M, Ungefroren H, Nusler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler J, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson J, Soria B, Parawaresch R, Heeckt P, Kremer B, Fändrich F, *Differentiation of in vitro modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells* (2005) *Gastroenterology* 128(7):1774-1786

San Antonio J D, Jacenko O, Yagami M, Tuan R S, *Polyonic regulation of cartilage development: Promotion of chondrogenesis in vitro by polylysine associated with altered glycosaminoglycan biosynthesis and distribution* (1992) *Dev Biol* 152:323-335

San Antonio J D, Tuan R S, *Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro stimulation by cations* (1986) *Dev Biol* 115:313-324

San Antonio J D, Winston BM, Tuan R S, *Regulation of chondrogenesis by heperan sulphate and structurally related glycosaminoglycans* (1987) *Dev Biol* 123:17-24

Schaefer D J, Klemm C, Zhang X H, Stark G B, *Tissue engineering mit mesenchymalen Stammzellen zur Knorpel- und Knochenneubildung* (2000) *Der Chirurg* 71: 1001-1008

Schöler H P, *Das Potential von Stammzellen – ist der Mensch regenerierbar?* (2003) *Naturwissenschaftliche Rundschau* 56(10):525-539

Schünke M, *Funktionelle Anatomie: Topographie und Funktion des Bewegungssystems* (2000), Thieme Verlag, 1 Auflage

Seiler CJ, Bischoff P, Nett PC, Candinas D, *Abnehmende Organspendebereitschaft als nationales Problem: Im Engagement liegt der Lösungsansatz* (2006) *Schweizerische Ärztezeitung* 87: 4

Shortkroff S, Barone L, Hsu H-P, Wrenn C, Gangne T, Chi T, Breinan H, Minas T, Sledge CB, Tubo R, Spector M, *Healing of chondral and osteochondral defects in canine model: The role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage.*(1996) *Biomaterials* 17: 147-154

Soria B, *Insulin secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice* (2000) *Diabetes* 49:157-161

Steinwachs MR, Kreuz PC, *Clinical Results of Autologous Chondrocyte Transplantation (ACT) Using a Collagen Membrane Cartilage Surgery and Future Perspectives.* (2003) *Cartilage Surgery and Future Perspectives*, Hrsg.: N. Hendrich, Eulert. Vol. Chapter 5: 37-47.

Stöve J, Schneider-Wals B, Scharf H P, Schwarz M L, *Bone morphogenetic protein 7 (bmp7) stimulates proteoglycan synthesis in human osteoarthritic chondrocytes in vitro* (2006) *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60 (10):639-643

Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, Waknitz M A, Swiergiel J J, Marshall V S, Jones J M, *Embryonic stem cell lines derived from human blastocytes* (1998) *Science* 282:1145-1147

Urist M R, *Bone formation by autoinduction* (1965) *Science* 150:893-899

Wroster A A, Brower-Toland B D, Fortier L A, Bent S J, Williams J, Nixon A J, *Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor  $\beta$ 1 in monolayer and insulin like growth factor in a three-dimensional matrix* (2001) *Journal of orthopaedic research* 19:738-749

Yamane S, Reddi A H, *Induction of chondrogenesis and superficial zone protein accumulation in synovial side population cells by BMP7 and TGF $\beta$ -1* (2008) *Ortop Res.* 26:485-492

## 7. Danksagung

Mein Dank gilt zuerst meinen Eltern und Daniel Engels, dem Mann meines Lebens, ohne deren ständige Unterstützung und Förderung ich den Weg, den ich gegangen bin niemals hätte gehen können.

Natürlich möchte ich mich auch ganz herzlich bei Prof. Dr. rer. nat. T. Pufe<sup>1</sup> bedanken, der trotz immer wieder verschobener Einreichung, noch die Geduld und Muße hatte meine Arbeit zu korrigieren und mich immer zu unterstützen.

Danke auch an das Laborteam mit dem ich sehr gerne zusammengearbeitet habe und Vieles gelernt habe.

Ein großes Dankeschön auch an Alle die sich noch bemüht habe diese Arbeit zum Ziel zu führen: Prof. Dr. med F. Fändrich<sup>2</sup>, Dr. med. M. Ruhnke<sup>2</sup>, Prof. Dr. rer. nat. H. Ungefroren<sup>2</sup>, Prof. Dr. med. W. Petersen<sup>3</sup>, D. Hoseas

1. Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universitätsklinikum RWTH Aachen
2. Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, Schwerpunkt Organtransplantation und Biotechnologie, UKSH Kiel
3. Klinik für Unfall-,Hand- u. Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum Münster

## 8. Curriculum vitae

Name: Stefanie Dressel

Adresse: Lornsenstr. 59, 24105 Kiel

Dienstadresse: UKSH Kiel, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie , Schittenhelmstr. 7, 24105 Kiel  
sdressel@dermatology.uni-kiel.de

Geburtsdatum, -ort: 03.07.1981, Düsseldorf

Familienstand: ledig

1997-2000: Abitur: Privatschule St. Ursula Gymnasium Düsseldorf

2000-2007: Studium der Humanmedizin, Christian Albrechts Universität zu Kiel

2004-2007: Promotion am Institut für Anatomie, Christian Albrechts Universität zu Kiel (Direktor: Prof. Dr. med. J. Sivers ): „Haben programmable cells of monocytic origin (PCMOs) als Stammzellen des peripheren Blutes das Potential, durch Stimulation mit bone morphogenetic protein (BMP)-7 und -2 zu Kollagen Typ II produzierenden Chondrozyten differenziert zu werden?“ eingereicht 2010

2006-2007: PJ :

New York University, Department of Medicine, Dr. J. Lowy,  
Dr. A. Pavlick, Palliative Care /Oncology

University of Toronto, Department of Medicine, Dr. O. Mourad,  
Dr. J.Goguen, General Internal Medicine / Endocrinology

sowie am Kreiskrankenhaus Rendsburg Abteilung: Chirurgie (Chefarzt:  
P.D. Dr. med. H. Dittrich, Dr. med. A. Friedrich )

sowie an der Hautklinik der Christian Albrechts Universität zu Kiel  
(Direktor: Prof. Dr. T. Schwarz)

seit 2007: Klinische und wissenschaftliche Tätigkeit an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Direktor: Prof. Dr. T. Schwarz)

In der Arbeitsgruppe von PD Regine Gläser im Rahmen des BMBF Förderungsprojektes: Skin Staph Tätigkeitsschwerpunkt: Wissenschaft und Forschung

### Preise und Ehrungen

2008: Posterpreis der norddeutschen dermatologischen Gesellschaft (NDG)

### Publikationen:

Pufe T, Petersen W, Fändrich F, Varoga D, Wruck CJ, Mentlein R, Helfenstein A, Hoseas D, **Dressel S**, Tillmann B, Ruhnke M. Programmable cells of monocytic origin (PCMO): a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes. *J Orthop Res*. 2008 Mar;26(3):304-13.

Harder J, **Dressel S\***, Wittersheim M, Cordes J, Meyer-Hoffert U, Mrowietz U, Fölster-Holst R, Proksch E, Schröder JM, Schwarz T, Gläser R. Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *Journal of Investigative Dermatology* 2010 Jan 28. [Epub ahead of print] \* **Co-Erstautor**

**Dressel S**, Harder J, Cordes J, Wittersheim M, Meyer-Hoffert U, Sunderkötter C, Gläser R. Differential expression of antimicrobial peptides in margins of chronic wounds. *Experimental Dermatology*, 2010 Jan 19. [Epub ahead of print]

**Dressel S**, Harder J, Gläser R, Antimikrobielle Peptide der Haut. Effektive körpereigene Antibiotika und ihre Rolle bei chronisch entzündlichen Erkrankungen. *Haut* 2009 (06): 223-225

**Abstarcts / Vorträge:**

Pufe T, Fändrich F, Ruhnke M, Varoga D, Hoseas D, **Dressel S**, Petersen W (2005) Differentiation of PCMOs (programmable cells of monocytic origin) to type II collagen producing chondrocytes. ORS-Transactions 2005: Paper No: 0968

**Dressel S**, Meyer-Hoffert J, Harder J, Fölster-Holst R, Schwarz T, Gläser R (2008): Ist die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden bei atopischer Dermatitis verändert? JDDG 6: 905 (V)

**Dressel S**, Meyer-Hoffert U, Harder J, Fölster-Holst R, Schwarz T, Schröder JM, Gläser R (2009): The *in vivo* expression and secretion of different antimicrobial peptides is induced in patients with atopic dermatitis independently of *S. aureus* colonization. Exp Dermatol 18: 286 (P).

Gläser R, **Dressel S** (2009): Staphylococcus aureus – Wann Kolonist und wann behandelnswerter Eindringling? JDDG 7 (Suppl 4): 36 (V)

**Dressel S**, Meyer-Hoffert U, Harder J, Fölster-Holst R, Schwarz T, Gläser R (2009): Ist die Expression und Sekretion antimikrobieller Peptide bei Patienten mit atopischer Dermatitis abhängig von der Besiedlung mit *S. aureus*? JDDG 7 (Suppl 4): 149 (V)

**Dressel S**, Cordes J, Wittersheim M, Meyer-Hoffert U, Harder J, Beissert S, Sunderkötter C, Gläser R (2009): The epidermal expression of antimicrobial peptides psoriasin and human beta defensin-2 is highly induced in the border region of chronic leg ulcers. J Invest Dermatol 129: S103 (P)

Gläser R, **Dressel S**, Meyer-Hoffert U, Fölster-Holst R, Schröder JM, Schwarz T, Harder J (2009): Induced *in vivo* expression and secretion of beta defensins, RNase 7 and psoriasin in patients with atopic dermatitis independently of *S. aureus*. J Invest Dermatol 129: S8 (P)

U. Meyer-Hoffert, J. Knoop, **S. Dressel**, F. Lipowski, J. Harder, J. Brasch, R. Gläser (2010) :Differential Regulation of Antimicrobial Peptides in Contact Dermatitis. Exp Dermatol 19: S167 (P)

M. Wittersheim, J. Cordes, U. Meyer-Hoffert, **S. Dressel**, J. Harder, J. Schröder, R. Gläser (2010): The immunohistochemical distribution of the antimicrobial peptides Psoriasin, RNase7, human beta-defensin-2 and -3 varies in healthy human skin. Exp Dermatol 19: S182 (P)

**S. Dressel**, J. Hader, M. Laudien, R. Gläser (2010): Differential expression of antimicrobial peptides in the vestibulum nasi and the secretion in nasal fluids. Exp Dermatol 19: S190 (P)

M. Simanski, **S. Dressel**, R. Gläser, J. Harder (2010): RNase 7 protects healthy skin from Staphylococcus aureus colonization. Exp Dermatol 19: S199 (P)

