

Entwicklung eines injizierbaren Zell-Matrix-Komposites zur Regeneration der Bandscheibe (*Nucleus pulposus*)

Einfluss verschiedener Stimuli auf die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in Richtung *Nucleus pulposus*-Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

des Fachbereiches Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Franziska Ehlicke
aus Karl-Marx-Stadt
(jetzt Chemnitz)

Gießen, August 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2009 bis August 2012 am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen im Rahmen des LOEWE-Schwerpunktes BioIM „Bioengineering & Imaging“ durchgeführt.

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Czermak
2. Gutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2013

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 1

Franziska Ehlicke

**Entwicklung eines injizierbaren Zell-Matrix-
Komposites zur Regeneration der Bandscheibe
(*Nucleus pulposus*)**

Einfluss verschiedener Stimuli auf die Differenzierung
von humanen mesenchymalen Stammzellen in Richtung
Nucleus pulposus-Zellen

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Aachen 2014

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2013

Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) durch den Fachbereich Biologie und Chemie (FB 08) der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

Copyright Shaker Verlag 2014

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-2568-2

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Veröffentlichungen

Publikationen

Freimark, D., **F. Ehlicke**, P. Czermak (2010). "The need for imaging methods in bioengineering of three-dimensional cell cultures." Int J Artif Organs 33(4): 193-7. DOI: 10.5301/IJAO.2010.4089

Ehlicke, F., D. Freimark, B. Heil, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010). "Intervertebral disc regeneration: influence of growth factors on differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSC)." Int J Artif Organs 33(4): 244-52. DOI: 10.5301/IJAO.2010.701

Ehlicke, F., T. Bergmann, D. Salzig, M. Pudlas, P. Czermak. "Raman spectra classification of biological samples by wavelet data processing." Vib Spectrosc (eingereicht)

Abstracts in Fachzeitschriften

Ehlicke, F., D. Freimark, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration of intervertebral disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells." Int J Artif Organs 33: 7, 441.

Ehlicke, F., D. Freimark, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration der Bandscheibe: Einfluss diverser Stimuli auf die Differenzierung von Stammzellen zu Bandscheibenzellen." Chemie Ingenieur Technik 82: 9, 1559 DOI: 10.1002/cite.201050085 [Special Issue: ProcessNet-Jahrestagung 2010 und 28. Jahrestagung der Biotechnologen; September, 2010]

Ehlicke, F., D. Freimark, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration of the intervertebral disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells." DOI: 10.1515/BMT.2010.119 Biomed Tech 55: Suppl. 1. Oct

Ehlicke, F., D. Freimark, M. Pudlas, A. Dorresteyn, H. Walles, P. Czermak (2011) "Regeneration of the intervertebral disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells." Int J Artif Organs 34:8, 690. DOI: 10.5301/IJAO.2011.8702

Salzig, D., **F. Ehlicke**, A. Dorresteyn, P. Czermak (2011) "Potential of mesenchymal stem cells for regeneration of intervertebral disc." Biomaterialien 12: 1-4, 198

Freimark, D., **F. Ehlicke**, A. Dorresteyn, P. Czermak (2011) "Regeneration of intervertebral disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells." Tissue Eng Part A 17:550 DOI: 10.1089/ten.tea.2010.1502 [Meeting abstract für BioStar 2010; 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine; October 13–15, 2010; Stuttgart, Germany]

Konferenzbeiträge (Vorträge)

Ehlicke, F., D. Freimark, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration of the intervertebral disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells." 3rd International Congress "Biotechnologies for Spinal Surgery – Biospine 3"; September 1-4, 2010, Amsterdam, The Netherlands

Ehlicke, F., D. Freimark, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration of the intervertebral disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells." XXXVII. European Society for Artificial Organs Congress (ESAO 2010); September 8-11, 2010, Skopje, Republic of Macedonia

Ehlicke, F., D. Freimark, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration der Bandscheibe unter Verwendung *in vitro* differenzierter Stammzellen." 44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik (BMT 2010); Oktober 5-8, 2010; Rostock, Deutschland

Konferenzbeiträge (Poster)

Ehlicke, F., D. Freimark, P. Czermak (2009) "Regeneration of Intervertebral Disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells; Influence of cell density and growth factors on differentiation" World Conference on Regenerative Medicine (WCRM 2009); October 29-31, 2009; Leipzig, Germany

Ehlicke, F., D. Freimark, B. Heil, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration of Intervertebral Disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells; Influence of cell density and growth factors on differentiation." World Forum for Spine Research 2010 – The Intervertebral Disc; July 5-8, 2010; Montreal, Canada

Ehlicke, F., D. Freimark, B. Heil, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration of Intervertebral Disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells; Influence of cell density and growth factors on differentiation." BioStar 2010; 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine; October 13–15, 2010; Stuttgart, Germany

Ehlicke, F., D. Freimark, B. Heil, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration of the Intervertebral Disc (IVD): Influence of various stimuli on the differentiation of stem cells into IVD cells; Influence of growth factors." Dechema Jahrestagung 2010; September 21-23, 2010; Aachen, Deutschland

Ehlicke, F., D. Freimark, A. Dorresteyn, P. Czermak (2010) "Regeneration of Intervertebral Disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells; Influence of cell density and growth factors on differentiation." American Chemical Society's 239th National Meeting; Paper 27361; March 21-25, 2010; San Francisco, USA

Ehlicke, F., D. Salzig, P. Czermak (2011) "Regeneration of the intervertebral disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells." XXXVIII. Congress of the European Society for Artificial Organs (ESAO 2011) and IV. Biennial Congress of the International Federation on Artificial Organs (IFAO 2011); October 9-12, 2011; Porto, Portugal

Ehlicke, F., D. Salzig, P. Czermak (2011) "Regeneration of the intervertebral disc (IVD) using in vitro differentiated stem cells." World Conference on Regenerative Medicine (WCRM 2011); November 2-4, 2010; Leipzig, Germany

Ehlicke, F., D. Salzig, P. Czermak (2012) "Regeneration Of The Intervertebral Disc (Nucleus pulposus); Influence of Various Stimuli On The Differentiation Of Human Mesenchymal Stem Cells Into The Lineage Of NP Cells." Perspectives in Cell- and Gene-Based Medicines (CGM 2012); March 15-17, 2012; Frankfurt/M., Germany

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Symbole und Abkürzungen	V
Zusammenfassung	VII
Abstract	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Bandscheibe.....	1
1.2 Aufbau der Bandscheibe	2
1.3 Degeneration der Bandscheibe	4
1.4 Therapie von Bandscheibendegeneration	8
1.4.1 Zelltherapie zur Regeneration von degenerierter Bandscheibe / des <i>Nucleus pulposus</i>	10
1.4.2 Charakterisierung humaner <i>Nucleus pulposus</i> -Zellen	15
1.4.3 Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen zur NP- Regeneration	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Zellkultur.....	25
2.1.1 Verwendete Zelllinien und Medien.....	25
2.1.2 Passagieren und Expansion	27
2.1.3 Bestimmung von Zellzahl, -vitalität und -proliferation.....	27
2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
2.1.5 Zelldifferenzierung	28
2.1.5.1 Zelldifferenzierung in Agarosehydrogelen	28
2.1.5.2 Zelldifferenzierung in Gelatinehydrogelen	29
2.1.6 Applikation von möglichen (Re-)Differenzierungsstimuli auf ZMKs	30
2.2 Analytische Methoden	32
2.2.1 Immunofluoreszenzfärbung.....	33
2.2.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	35
2.2.3 Raman-Spektroskopie.....	35
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	40
2.2.4.1 RNA-Isolierung	40
2.2.4.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von isolierter RNA	42

2.2.4.3	cDNA-Synthese für Endpunkt-RT-PCR	43
2.2.4.4	Polymerasekettenreaktion (Endpunkt-RT-PCR)	44
2.2.4.5	Gelelektrophorese	46
2.2.4.6	cDNA-Synthese für quantitative Echtzeit-RT-PCR.....	47
2.2.4.7	Quantitative Echtzeit-RT-PCR (qRT-PCR).....	47
3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	51
3.1	Eignung verschiedener Analysemethoden zur Unterscheidung der Primärzellen hNPC und hCHON sowie der Zelllinie hMSC-TERT	51
3.1.1	Analytik mittels Hellfeld-Mikroskopie	52
3.1.2	Analytik mittels Immunofluoreszenz	53
3.1.3	Analytik mittels Raman-Spektroskopie	58
3.1.4	Analytik mittels PCR.....	67
3.1.5	Analytik mittels qPCR.....	73
3.2	Applikation von Stimuli zur Differenzierung von hMSC-TERT in Richtung hNPC	78
3.2.1	Einfluss von Differenzierungsmedium / Nährstoffverfügbarkeit.....	78
3.2.2	Einfluss von Wachstumsfaktoren.....	81
3.2.3	Einfluss von Komponenten der extrazellulären Matrix	85
3.2.4	Einfluss der Stützmatrix (Hydrogel)	88
3.2.5	Einfluss von Ultraschall	93
3.2.6	Diskussion zur Differenzierung von hMSC-TERT	97
3.3	Applikation von Stimuli zur Redifferenzierung von hNPCs	108
3.3.1	Einfluss der Nährstoffverfügbarkeit.....	108
3.3.2	Einfluss der extrazellulären Matrix	110
3.3.3	Einfluss der Stützmatrix (Hydrogel)	111
3.3.4	Einfluss von Ultraschall	113
3.3.5	Diskussion zur Redifferenzierung von hNPCs.....	116
3.4	Applikation von Stimuli zur Redifferenzierung von hCHONs	120
3.4.1	Einfluss der Stützmatrix (Hydrogel)	120
3.4.2	Diskussion zur Redifferenzierung von hCHONs	123
4	<i>Schlussfolgerung und Ausblick</i>	125
	<i>Literaturverzeichnis</i>	127
	<i>Danksagung</i>	143

Anhang	145
A0	Zusätzliche Angaben zur Reinheit isolierter RNA 145
A1	Zusätzliche Analytik zum Einfluss von Differenzierungsmedium / Nährstoffverfügbarkeit auf die Differenzierung von hMSC-TERT 146
A1.1	Analytik mittels PCR..... 146
A1.2	Analytik mittels qPCR..... 147
A2	Zusätzliche Analytik zum Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung von hMSC-TERT 150
A2.1	Analytik mittels Immunofluoreszenz 150
A2.2	Analytik mittels PCR..... 155
A2.3	Analytik mittels qPCR..... 158
A3	Zusätzliche Analytik zum Einfluss von Komponenten der extrazellulären Matrix auf die Differenzierung von hMSC-TERT 162
A3.1	Analytik mittels PCR..... 162
A3.2	Analytik mittels qPCR..... 166
A4	Zusätzliche Analytik zum Einfluss der Stützmatrix (Hydrogel) auf die Differenzierung von hMSC-TERT 170
A4.1	Analytik mittels PCR..... 170
A4.2	Analytik mittels qPCR..... 172
A5	Zusätzliche Analytik zum Einfluss von Ultraschall auf die Differenzierung von hMSC-TERT 176
A5.1	Analytik mittels Immunofluoreszenz 176
A5.2	Analytik mittels PCR..... 180
A5.3	Analytik mittels qPCR..... 183
A6	Zusätzliche Analytik zum Einfluss von Nährstoffverfügbarkeit auf die Redifferenzierung von hNPCs 187
A6.1	Analytik mittels PCR..... 187
A6.2	Analytik mittels qPCR..... 188
A7	Zusätzliche Analytik zum Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Redifferenzierung von hNPCs 191
A7.1	Analytik mittels PCR..... 191
A7.2	Analytik mittels qPCR..... 193
A8	Zusätzliche Analytik zum Einfluss der Stützmatrix (Hydrogel) auf die Redifferenzierung von hNPCs 196
A8.1	Analytik mittels PCR..... 196

A8.2	Analytik mittels qPCR.....	197
A9	Zusätzliche Analytik zum Einfluss von Ultraschall auf die Redifferenzierung von hNPCs	199
A9.1	Analytik mittels Immunofluoreszenz	199
A9.2	Analytik mittels PCR.....	200
A9.3	Analytik mittels qPCR.....	201
A10	Zusätzliche Analytik zum Einfluss der Stützmatrix (Hydrogel) auf die Redifferenzierung von hCHONs.....	204
A10.1	Analytik mittels PCR.....	204
A10.2	Analytik mittels qPCR.....	205
Lebenslauf		207