

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tobias Renkawitz

Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie
Leitung: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Solvig Diederichs

**Die Relevanz der AKT-Aktivierung für die
In-vitro-Chondrogenese humaner mesenchymaler Stromazellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
an der
Medizinischen Fakultät Heidelberg
der
Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von
Felicia Anna Maria Klampfleuthner
aus
Prien am Chiemsee
2023

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hans-Georg Kräusslich

Doktormutter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Solvig Diederichs

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Knorpel	1
1.1.1 Aufbau von artikulärem Knorpel.....	1
1.1.2 Embryonale Knorpelentwicklung und enchondrale Ossifikation	3
1.1.3 Knorpeldefekte und zellbasierte Therapieansätze	7
1.2 Mesenchymale Stromazellen als vielversprechende Zellalternative für die Reparatur artikulären Knorpels	9
1.2.1 MSC-basiertes Tissue Engineering von Knorpelgewebe <i>in vitro</i>	10
1.2.2 Chondrogene Bedingungen für die <i>In-vitro</i> -Knorpelneogenese mit MSC	10
1.2.3 Enchondrale Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen	11
1.2.4 Relevante Signalwege für die enchondrale Differenzierung	12
1.2.5 Methoden zur Reduktion der Hypertrophie während der MSC-Chondrogenese..	16
1.3 Der IGF1/PI3K/AKT-Signalweg	17
1.3.1 Aktivierung und zellintrinsische Deaktivierung des PI3K/AKT-Signalweges	18
1.3.2 Externe und endogene AKT-Agonisten während der MSC-Chondrogenese <i>in vitro</i>	20
1.3.3 Pro-chondrogene Funktion des IGF1/AKT-Signalweges.....	21
1.3.4 Bedeutung von AKT für den hypertrophen Chondrozytenphänotyp	22
1.4 Zielsetzung.....	24
2 Materialien	25
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.2 Wachstumsfaktoren, Hormone und Enzyme	27
2.3 Inhibitoren	28
2.4 Antikörper.....	28
2.4.1 Histologie	28
2.4.2 Westernblot	28
2.5 Kits.....	29
2.6 Verbrauchsmaterialien	29
2.7 Primer	30
2.8 Puffer und Lösungen.....	31
2.8.1 Allgemeine Puffer	31
2.8.2 Zellkultur-Puffer	31
2.8.3 Puffer für SDS-PAGE und Westernblot.....	31
2.8.4 Puffer für Glykosaminoglykan-Quantifizierung	32
2.8.5 Puffer für die DNA-Quantifizierung	33
2.8.6 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.9 Zellkulturmedien.....	33
2.10 Geräte.....	34
2.11 Software.....	35

3 Methoden	36
3.1 Rechtliche und ethische Aspekte der Studie	36
3.2 Zellkultur	36
3.2.1 Gelatine-Beschichtung von Zellkulturplastik.....	36
3.2.2 MSC-Isolation aus Knochenmark.....	36
3.2.3 AC-Isolation aus Knorpelbiopsien	37
3.2.4 Trypsin/EDTA-Behandlung	38
3.2.5 Kryo-Konservierung und Auftauen von Zellen.....	38
3.2.6 <i>In-vitro</i> -Knorpelneogenese von MSC und AC in 3D-Pelletkultur	39
3.2.7 Ernte von Pellets und Zellkulturüberständen.....	39
3.3 Histologische Analysen	39
3.3.1 Fixierung und Paraffineinbettung von MSC- und AC-Pellets für histologische Untersuchungen	39
3.3.2 Anfertigen von Mikrotomschnitten.....	40
3.3.3 Entparaffinierung, Rehydrierung und Dehydrierung von Schnitten.....	40
3.3.4 Safranin-O-Färbung.....	40
3.3.5 Immunhistochemische Detektion von Kollagen Typ II	40
3.4 Biochemische Analysen	41
3.4.1 Herstellung von Proteinlysaten	41
3.4.2 SDS-PAGE.....	41
3.4.3 Westernblot	42
3.4.4 Densitometrische Analyse	43
3.4.5 Quantifizierung des Glykosaminoglykangehalts in Pellets und Zellkulturüberständen.....	43
3.4.6 Quantifizierung des DNA-Gehalts in Pellets.....	44
3.4.7 Bestimmung der ALP-Aktivität in Zellkulturüberständen.....	44
3.5 Molekularbiologische Methoden	45
3.5.1 RNA-Isolation	45
3.5.2 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)	45
3.5.3 Quantitative Real-Time PCR.....	46
3.5.4 Auswertung der Real-Time PCR.....	47
3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese	47
3.6 Statistik	48
4 Ergebnisse	49
4.1 Hinweise auf unterschiedliche AKT-Aktivierung in MSC und AC durch Analyse von Microarray-Daten	49
4.2 Antikörper-Etablierung zum Nachweis der AKT-Phosphorylierung auf Proteinebene.....	51
4.3 AKT-Aktivierung zu Beginn der 3D-Knorpelneogenese von MSC und AC.....	52
4.3.1 Vergleich der pAKT-Proteinspiegel zu Beginn der 3D-Knorpelneogenese von MSC und AC.....	52
4.3.2 Erhöhung der initialen AKT-Aktivierung durch Insulin und PDGF-BB.....	53
4.3.3 Effekte erhöhter initialer pAKT-Spiegel auf die frühe MSC-Chondrogenese	55
4.4 AKT-Aktivierung während der frühen MSC-Chondrogenese bis Tag 7	57
4.4.1 Verlauf der AKT-Phosphorylierung in chondrogen induzierten MSC-Pellets an Tag 1	57
4.4.2 Effekt von TGF β 1 und Dexamethason auf Insulin-induzierte AKT-Phosphorylierung an Tag 1 der MSC-Chondrogenese	58

4.4.3 Vergleich der AKT-Aktivierung von MSC und AC in der frühen 3D-Pelletkultur...	59
4.4.4 Effekte von Insulin- und PDGF-BB-Behandlung bis Tag 7 der MSC-Chondrogenese	61
4.5 Verlauf der AKT-Aktivierung während enchondraler MSC-Differenzierung und chondraler AC-Redifferenzierung	65
4.5.1 Charakterisierung der hypertrophen MSC-Chondrogenese im Vergleich zur AC-Redifferenzierung	65
4.5.2 Vergleich der AKT-Aktivierung während enchondraler MSC-Chondrogenese und chondraler AC-Redifferenzierung.....	67
4.5.3 Abhängigkeit der AKT-Aktivierung von TGFβ1, BMP-, FGFR- und WNT-Signaling	68
4.6 Die funktionale Klassifizierung des AKT-Signalweges für die MSC-Chondrogenese	73
4.6.1 Nachweis reduzierter AKT-Aktivierung durch den PI3K-Inhibitor LY294002	73
4.6.2 Einfluss von 25 µM LY294002 auf die enchondrale MSC-Differenzierung	74
4.6.3 Regulation der <i>PTH1H</i> -Expression durch AKT-Aktivität.....	75
4.6.4 Effekte von 0,25 µM, 1,25 µM oder 2,5 µM LY294002 auf hypertrophe und osteogene Marker.....	77
4.6.5 Bedeutung von AKT-Aktivierung für die chondrogene Differenzierung von MSC	79
4.6.6 Relevanz der AKT-Aktivierung für TGFβ-Signaling und SOX9-Proteinakkumulation.....	80
5 Diskussion	82
5.1 Abhängigkeit der AKT-Aktivierung vom Differenzierungsstadium	83
5.2 Bedeutung ausgewogener AKT-Aktivierung für die frühe MSC-Chondrogenese	84
5.3 Regulation der differenzierungsabhängigen AKT-Aktivierung durch TGFβ und FGFR-Aktivität	86
5.4 AKT als Regulator der chondrogenen Differenzierungsgeschwindigkeit.....	88
5.5 Hinweise auf eine multifaktorielle AKT-Funktion für die MSC-Chondrogenese.....	89
5.6 Limitierungen der Studie	91
5.7 Fazit und Ausblick	92
6 Zusammenfassung.....	94
7 Literaturverzeichnis	96
Eigenanteil an Datenerhebung und -auswertung	IX
Eigene Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.....	X
Lebenslauf.....	XIII
Danksagung	XIV
Eidesstattliche Versicherung	XVI

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
3D	Dreidimensional
AC	Artikuläre Chondrozyten
ACAN	Aggrekan (Genname)
ACI	Autologe Chondrozytenimplantation
AKT	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i> (engl.)
ALK	<i>Activin receptor like kinase</i> (engl.)
ALP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivatorprotein 1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (<i>aqua destillata</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein (engl. <i>bone morphogenetic protein</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Rinderserum (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
Bzw.	Beziehungsweise
Ca	Kalzium (engl. <i>calcium</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL	Kollagen (engl. <i>collagen</i>)
CPSF6	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6</i> (engl.)
CREB	<i>cyclicAMP Responsive Element Binding Protein</i> (engl.)
Ct	Schwellenwertzyklus (engl. <i>cycle threshold</i>)
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
ED ₅₀	Mittlere Effektivdosis

ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (engl.)
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	Englisch
et al.	Und andere (lat.: <i>et alii/aliae</i>)
Exp.	Experiment
FCS	Fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. <i>fibroblast growth factor</i>)
FGFR	FGF-Rezeptor
g	Gramm
G/C	Guanin/Cytosin
GAG	Glykosaminoglykan
GDF	Wachstums-/Differenzierungsfaktor (engl. <i>growth/differentiation factor</i>)
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
Hz	Hertz
IBSP	Integrin bindendes Sialoprotein
IGF1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 (engl. <i>insulin-like growth factor 1</i>)
IGF1R	IGF1-Rezeptor
INS	Insulin
IR	Insulin-Rezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
IHH	<i>Indian hedgehog</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Ktrl	Kontrolle
l	Liter
LAP	<i>Latency-Associated Peptide</i>
lat.	Latein
LDN-21	LDN-212854
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i> (engl.)
LRP	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein</i> (engl.)
LR3-IGF	<i>Long Arginine(R) 3-IGF1</i> (engl.)
LTBP	<i>Latent TGF-beta binding protein</i> (engl.)
LY	LY294002
m	Milli; Meter
M	Molar

Abkürzungsverzeichnis

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (engl. <i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (engl.)
MSC	Mesenchymale Stromazellen (engl. <i>mesenchymal stromal cells</i>)
mTORC	<i>Mechanistic target of rapamycin complex</i> (engl.)
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OZ	Ossifikationszentrum
p; P	Phospho, p-Wert; Passage
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PDGF	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (engl. <i>platelet-derived growth factor</i>)
PD	PD173074
PDPK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i> (engl.)
PFA	Paraformaldehyd
pH; PH	Latein: <i>potentia hydrogenii</i> ; Pleckstrin-Homologie
PHLPP	<i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatases</i> (engl.)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol(4,5)-biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> (engl.)
PTH1R	PTH-Rezeptor
PTHrP/ <i>PTHrLH</i>	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR (<i>real-time quantitative PCR</i>)
RI	Rezeptor Typ I
RII	Rezeptor Typ II
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPL13	Ribosomales Protein L13
RT	Raumtemperatur (circa 20°C); Reverse Transkriptase
RUNX	<i>Runt related transcription factor</i>
Safranin O	Safranin Orange
SARA	<i>SMAD anchor for receptor activation</i> (engl.)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfat</i>)

SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SH2	<i>Src homology 2</i> (engl.)
SHIP	<i>SH2-domain-containing inositol 5'-phosphatase</i> (engl.)
SMAD	<i>SMA and mothers against decapentaplegic</i> (engl.)
SOX9	<i>Sex determining region y-related high-mobility group box 9</i> (engl.)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TCF	<i>T-cell factor</i> (engl.)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (engl. <i>unit</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil (engl. <i>volume/volume</i>)
vs.	versus
w/v	Gewichtsanteil (engl. <i>weight/volume</i>)
x g	g-Kraft

1 Einleitung

1.1 Knorpel

Neben Muskeln und Knochen stellt Knorpel einen essentiellen Bestandteil des skelettalen Stütz- und Bewegungsapparates dar. Knorpel besteht aus spezialisierten Knorpelzellen, den Chondrozyten, und einer von ihnen sekretierten, faserhaltigen extrazellulären Matrix (EZM), die primär aus Kollagenen, Proteoglykanen und Wasser besteht. Je nach Zusammensetzung werden drei unterschiedliche Knorpelarten unterschieden. Während elastischer Knorpel an nur wenigen Stellen wie Ohrmuschel oder äußerem Gehörgang vorkommt und zusätzlich zu Kollagen Typ II auch elastische Fasern enthält, ist Faserknorpel primär durch ein von Typ-I-Kollagen gebildetes Fasergeflecht und enorme Zugfestigkeit gekennzeichnet. Er enthält einen vergleichsweise geringen Matrixanteil, ist wenig elastisch und kommt beispielsweise in den Menisken vor. Hyaliner Knorpel ist durch variable Anordnungsmuster der Kollagenfibrillen auch bei hohen Biegungsbelastungen stabil und hält mit einem Wassergehalt von 60 – 70% enormen Druckbelastungen stand. Als wenige Millimeter dicke Schicht überzieht hyaliner Knorpel die Epiphysen von Knochen, die an der Bildung echter Gelenke (*lat.* articulatio) beteiligt sind. Zusammen mit der Synovialflüssigkeit ermöglicht hyaliner, artikulärer Knorpel durch seine glatte Oberfläche reibungslose Bewegungsabläufe im Gelenk und schützt Knochen durch Kraftabsorption vor Schädigung.

Da artikulärer Knorpel weder von Nerven noch Blutgefäßen durchzogen ist, ist die intrinsische Regenerationsfähigkeit dieses Gewebes nur schwach ausgeprägt. Unbehandelte artikuläre Knorpeldefekte werden durch körpereigene Reparaturmechanismen mit fibrösem Knorpelgewebe gefüllt. Dieses fibröse Ersatzmaterial weist im Gegensatz zu hyalinem Knorpel einen hohen Reibungskoeffizienten und nur geringe Druckstabilität auf. Daraus resultierende geringwertigere biomechanische Eigenschaften im Gelenk legen oftmals den Grundstein für degenerative Erkrankungen wie Arthrose. Im arthrotischen Gelenk wird die Knorpelschicht sukzessive abgebaut und der darunter liegende Knochen freigelegt, was zu großer Schmerzbelastung, vollständiger Immobilität des Patienten und langfristig zur Notwendigkeit führen kann, das Gelenk mittels endoprothetischer Verfahren zu ersetzen (Rabenberg 2013). Um dieser Entwicklung zuvorzukommen, wird intensiv an Therapieansätzen zur Behandlung lokaler Knorpeldefekte geforscht, die stets darauf abzielen, die Zusammensetzung des Reparaturgewebes so genau wie möglich an hyalinen Gelenkknorpel anzupassen, um eine möglichst ursprüngliche Gewebesituation im Gelenk wiederherzustellen.

1.1.1 *Aufbau von artikulärem Knorpel*

Artikulärer Knorpel ist beim Menschen zwei bis vier Millimeter dick und wird aufgrund variierender Zusammensetzung von Matrixkomponenten und Chondrozytenmorphologie in vier

Zonen eingeteilt (Abbildung 1). Die **Oberflächenzone** macht zwischen 10 - 20% der Gesamtdicke aus, steht mit der Synovialflüssigkeit in Kontakt und ist für die Gleitfähigkeit im Gelenk maßgeblich. Die Chondrozyten dieser Zone sind flach und die dicht gepackten Fasern aus Kollagen Typ II und Typ IX parallel zur Knorpeloberfläche ausgerichtet, was zum Schutz der unteren Schichten vor Scher- und Zugkräften beiträgt.

Die sich anschließende **mittlere oder Übergangszone** macht bis zu 60% des Knorpelvolumens aus. Sie ist durch wenige Chondrozyten mit runder Zellmorphologie und einen hohen Proteoglykangehalt gekennzeichnet. Der hohe Wassergehalt und die ungleichmäßige Anordnung der im Vergleich zur Oberflächenzone dickeren Kollagen-Typ-II-Fibrillen tragen zur Resilienz gegen Druckbelastung bei.

In der **tiefen Zone** sind die rundlichen Chondrozyten säulenartig aneinandergereiht. Durch die zur Knorpeloberfläche senkrechte Ausrichtung der stabilen Kollagen-Typ-II-Fibrillen und einen hohen Proteoglykangehalt mit maximaler Aggregatkonzentration bietet diese Zone den größten Widerstand gegen Druckbelastungen.

Die Kollagen-Typ-II-Fibrillen der tiefen Zone reichen über die Tidemark, einer histologisch färbaren Trennlinie, in die sich anschließende **kalzifizierte Zone**. Diese enthält nur wenige, vergrößerte Chondrozyten (Oliveira Silva et al. 2020). Dieser sogenannte hypertrophe Chondrozytenphänotyp ist durch Kollagen Typ X und hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) charakterisiert, was zur Mineralisierung dieser Zone beiträgt. Die kalzifizierte Zone verankert als wichtige Übergangszone den hyalinen Knorpel an den subchondralen Knochen und garantiert somit die Integrität des Gelenks (Bhosale und Richardson 2008; Matsiko et al. 2013; Sophia Fox et al. 2009).

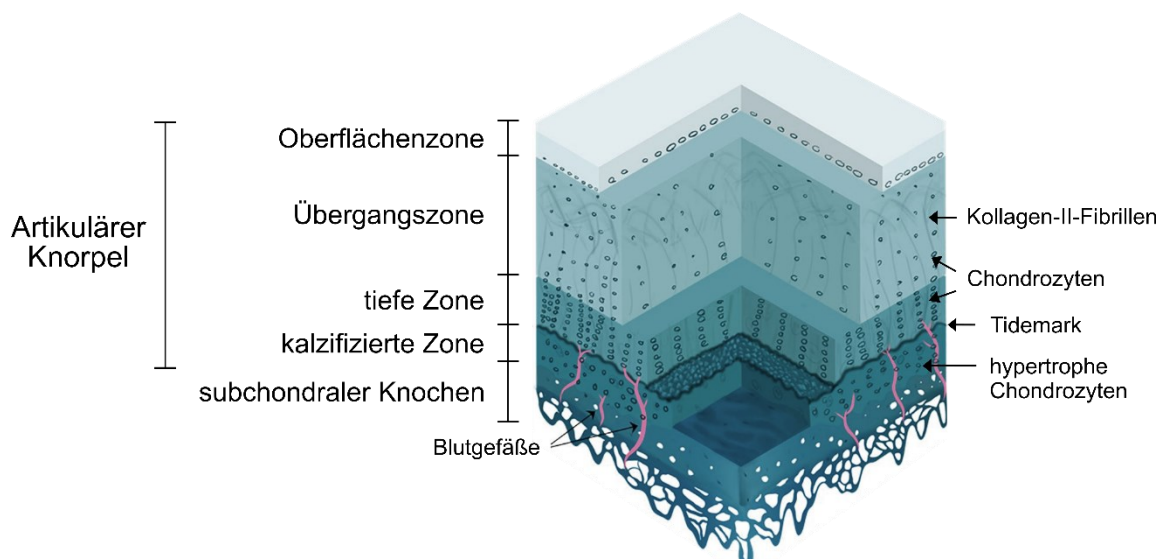


Abbildung 1: Schematische Übersicht des zonalen Aufbaus von artikulärem Knorpel. Modifiziert nach Oliveira Silva et al. 2020.

Die zelluläre Komponente von Gelenkknorpel stellen artikuläre Chondrozyten (AC) dar, ein spezialisierter Zelltyp mit rundlicher Morphologie. Sie produzieren und sekretieren die EZM-Komponenten und machen beim Menschen etwa 1% des Knorpelvolumens aus (Stockwell 1967). In der Folge werden AC mit fortlaufender EZM-Synthese und zunehmender Knorpelmasse auseinander geschoben, was als interstitielles Wachstum bezeichnet wird. Die am häufigsten in Knorpelgewebe vorkommenden Makromoleküle sind Kollagene (60% der Trockenmasse) und Proteoglykane (etwa 30%), wohingegen seltenere Matrixkomponenten wie Lipide, Phospholipide, nicht-kollagenartige Proteine und Glykoproteine zusammen nur etwa 1% der Knorpeltrockenmasse ausmachen.

Kollagene bestehen aus drei linksgängigen α -Polypeptidketten, die sich zu einer kompakt gewickelten, rechtsgängigen Superhelix zusammenfinden (Gelse et al. 2003). Diese dichte Wicklung ist ausschlaggebend für die Zugfestigkeit und trägt entscheidend zur Etablierung eines robusten Netzwerkes bei, das auch anderen Strukturkomponenten festen Halt in der Matrix bietet. Unter insgesamt 7 unterschiedlichen Kollagenarten im hyalinen Knorpel ist Kollagen Typ II (Gen: *COL2A1*) mit 90 - 95% der Trockenmasse das häufigste Makromolekül der EZM und bildet Fibrillen und Fasern, die von den Kollagenen Typ IV, V, VI, IX und XI stabilisiert werden (Eyre 1991). Typisch für die mineralisierte Übergangszone zwischen Knorpel und Knochen ist Kollagen Typ X (Gen: *COL10A1*).

Die zweitgrößte Gruppe von Makromolekülen im hyalinen Knorpel stellen **Proteoglykane** dar, die aus einem Kernprotein und einem oder mehreren kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen bestehen. Diese unverzweigten Kohlenhydratketten sind wiederum aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten aufgebaut. Die häufigsten Glykosaminoglykane im Knorpel stellen Chondroitin- und Keratansulfatketten dar. Proteoglykane weisen durch ihren hohen Anteil negativer Ladung an Sulfat- und Carboxylatgruppen eine große Wasserbindekapazität auf und sind somit entscheidend für die Kompensation von Druckbelastungen und die Elastizität von Knorpelgewebe (Roughley und Lee 1994). Das größte und häufigste Proteoglykan im Knorpel ist Aggrekan (Gen: *ACAN*), das aus mehr als 100 Chondroitin- und Keratansulfatketten besteht (Hardingham und Fosang 1992). Es kommt als Polymer zahlreicher Aggrekanmoleküle vor, die nicht-kovalent an Hyaluronan gebunden sind (Kiani et al. 2002; Roughley und Lee 1994). Kleinere Proteoglykane wie Dekorin, Biglykan und Fibromodulin sind nicht direkt an der Knorpelstabilität beteiligt, tragen durch Interaktion mit Kollagenen aber zur Organisation des Fibrillennetzwerkes bei und beeinflussen durch das Binden von Wachstumsfaktoren die Chondrozytenaktivität (Cohen et al. 1998; Temenoff und Mikos 2000).

1.1.2 Embryonale Knorpelentwicklung und enchondrale Ossifikation

Da im Embryo alle später als Knochen vorliegenden Strukturen mit Ausnahme des Schädels zuerst als hyaliner Knorpel angelegt werden, ist Knorpel als Primordialskelett der entscheidende Strukturgeber des embryonalen Wirbeltierkörpers. Während embryonale

Knorpelstrukturen der Kopfregion wie beispielsweise Teile der Nasenhöhle aus kranialen Neuralleistenzellen des Ektoderms entstehen, stammt das knorpelige Primordialskelett des Bewegungs- und Stützapparates vom Mesoderm, dem mittleren embryonalen Keimblatt, ab (Gans und Northcutt 1983; Kaucka und Adameyko 2019). Als einer der ersten Schritte der Knorpelentwicklung migrieren mesenchymale Vorläuferzellen im sich entwickelnden Embryo zunächst in künftige Skelettbereiche und kondensieren, was einer Erhöhung der Zelldichte ohne Zellvermehrung entspricht (DeLise et al. 2000). Die Zellen im Inneren der Kondensation beginnen nach einer kurzen Adaptationsphase mit arretiertem Zellzyklus zu proliferieren (Fell 1925; Solursh und Reiter 1975) und werden von mehreren Schichten mesenchymaler Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie umgeben, die das Perichondrium bilden (Egawa et al. 2014; Kronenberg 2007). Die chondrogene Differenzierung der proliferierenden Zellen im Kondensationszentrum wird einerseits durch die bei der Kondensation etablierten Zell-Zell-Kontakte und andererseits durch die Knochenmorphogeneseproteine (engl. *bone morphogenic proteins*, BMPs) 2, 4 und 7 sowie *fibroblast growth factor* (FGF)18 induziert, die von perichondrialen Zellen sekretiert werden (DeLise et al. 2000; Kronenberg 2003; Ohbayashi et al. 2002). Die so entstehenden Prächondroblasten beginnen den Transformierenden Wachstumsfaktor β (engl. *transforming growth factor β* , TGF β) und BMPs zu exprimieren. TGF β und BMP initiieren eine weitere Differenzierung der Zellen in Chondroblasten und letztlich Chondrozyten, indem sie unter anderem die Expression des wichtigsten Transkriptionsfaktors der Chondrogenese, *sex determining region y-box 9* (SOX9), induzieren und aufrechterhalten (Bi et al. 1999; Lefebvre und Smits 2005; Thielen et al. 2019; Yoon et al. 2005). Die dadurch vermittelte kontinuierliche Sekretion von Proteoglykanen und Kollagen Typ II in die Mikroumgebung der Chondrozyten führt zur Expansion des Knorpelgewebes und zur Ausbildung des Primordialskeletts. Alle Skelettelemente, die, wie beispielsweise Teile der Nase oder artikulärer Knorpel, im adulten Körper nicht durch Knochen ersetzt werden, verbleiben in diesem Stadium. Alle anderen später knöchernen Strukturen durchlaufen bereits ab der sechsten Woche der Embryonalentwicklung den Prozess der **enchondralen Ossifikation** (Abbildung 2), in deren Verlauf Knorpelgewebe zu Knochen umgewandelt wird. Im ersten Schritt der enchondralen Ossifikation reduzieren Chondrozyten die Sekretion typischer Matrix-Komponenten von hyalinem Knorpel wie Kollagen Typ II und Aggrecan und bilden unter Vergrößerung ihres Zellvolumens einen sogenannten hypertrophen Phänotyp aus. Hypertrophe Chondrozyten sekretieren vermehrt Kollagen Typ X, was den Beginn der Gewebemineralisierung einläutet (Schmid und Linsenmayer 1985; Shen 2005). In dieser frühen Phase der Mineralisierung spaltet die Alkalische Phosphatase (ALP, Gen: *ALPL*) anorganisches Pyrophosphat zu Phosphat, das in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen Hydroxylapatit bildet (Balcerzak et al. 2003; Magne et al. 2003; Millán 2013). Zur Stabilisierung der verknöchernenden Matrix trägt das Integrin-bindende Sialoprotein (engl. *integrin binding sialo protein*, Gen: *IBSP*) bei, das ebenfalls von hypertrophen Chondrozyten sekretiert wird und die Bildung von Hydroxylapatit unterstützt (Ganss et al.

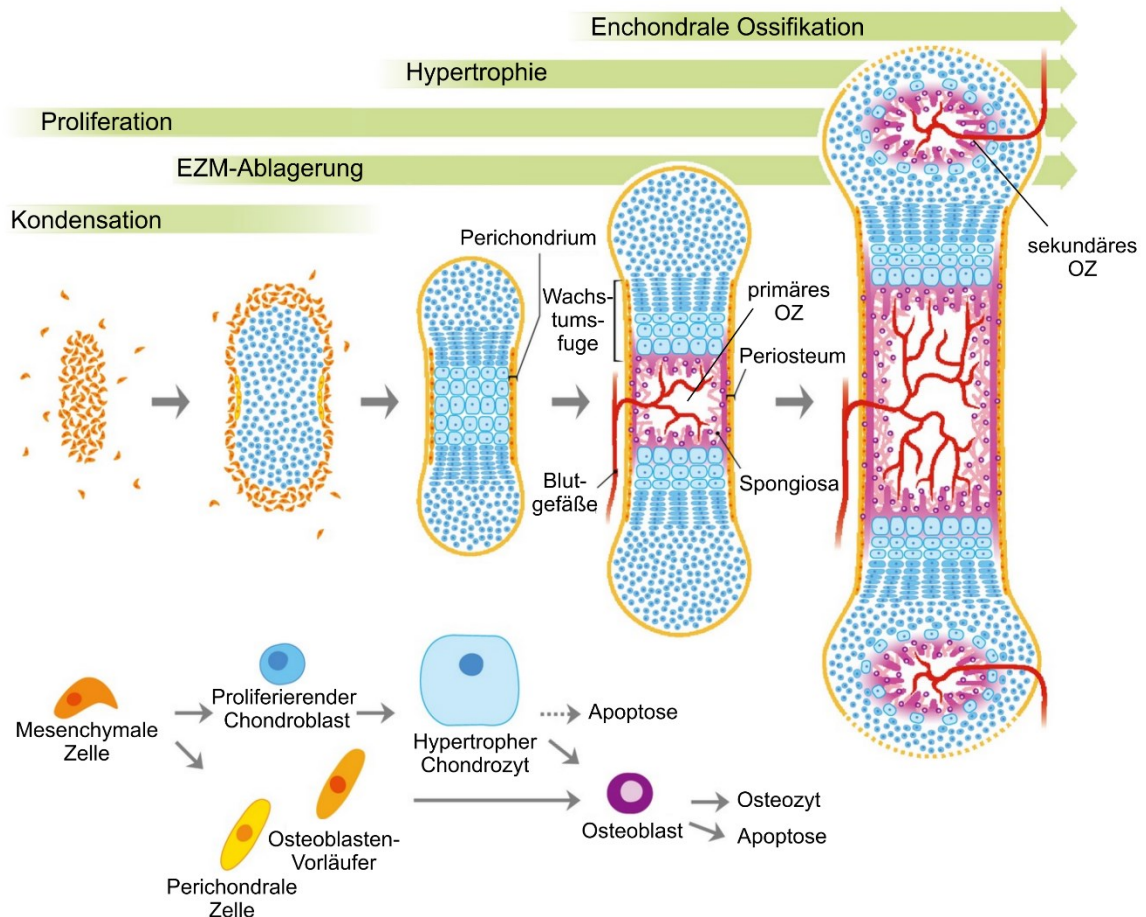


Abbildung 2: Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation. OZ = Ossifikationszentrum. Modifiziert nach Egawa et al., 2014.

1999; Hunter und Goldberg 1993). Weitere hypertrophe Marker sind *parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor* (Gen: *PTH1R*) und *Indian hedgehog* (Gen: *IHH*), deren Expression die enchondrale Differenzierung der hypertrophen Chondrozyten weiter vorantreibt (Karp et al. 2000; Vortkamp et al. 1996). Im letzten Stadium der Gewebemineralisierung kontrollieren Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), vornehmlich die Kollagenasen MMP1 und MMP13 und die Gelatinasen MMP2 und MMP9, den Abbau der verkalkten Matrix und bereiten das Gewebe somit auf die Vaskularisierung vor (Ortega et al. 2004; Shiomi et al. 2010; Studer et al. 2012). Der durch Kollagen Typ X, ALP-Aktivität, IBSP und MMPs induzierte Umbau des ursprünglich knorpeligen Gewebes ermöglicht das Eindringen von Vorläuferzellen, die zu Osteoblasten differenzieren und Knochenmatrix aufbauen, sowie von Endothel- und hämatopoetischen Zellen, die das Knochenmark bilden. Im weiteren Verlauf der Verknöcherung werden neben dem sogenannten primären Ossifikationszentrum in der Diaphyse des Röhrenknochens auch sekundäre Ossifikationszentren in den Epiphysen ausgebildet. Um Längenwachstum im Knochen zu ermöglichen bleibt ein Knorpelabschnitt zwischen primärem und sekundärem Ossifikationszentrum, die sogenannte Wachstumsfuge, von der

Mineralisierung ausgeschlossen (Abbildung 3). Diese sogenannte Wachstumsfuge besteht aus drei morphologisch unterscheidbaren Zonen, die aus ruhenden, proliferierenden oder hypertrophen Chondrozyten bestehen. Jede dieser Chondrozytenpopulationen vermittelt spezifische Prozesse in Längenwachstum und Mineralisierung. Die Chondrozyten der ruhenden Zone speisen zum einen kontinuierlich neue Zellen in die proliferierende Zone ein, die sonst durch die hypertrophe Weiterdifferenzierung der proliferierenden Chondrozyten sukzessive an Volumen verlieren würde. Zum anderen exprimieren die Chondrozyten der ruhenden Zone *parathyroid-related protein* (PTHrP, Gen: *PTH1LH*), das die Zellvermehrung in den benachbarten proliferierenden Chondrozyten aufrechterhält und gleichzeitig ihre hypertrophe Differenzierung verzögert (Vortkamp et al. 1996), was ein vorzeitiges Schließen der Wachstumsfuge verhindert. Sobald ruhende Chondrozyten ihren Ruhezustand verlassen, unterliegen sie einer morphologischen Umwandlung in flache, säulenartig angeordnete Chondrozyten, die proliferieren. Durch Zellvermehrung und EZM-Ablagerung der proliferierenden Chondrozyten werden Diaphyse und Epiphyse auseinandergeschoben, was den Knochen in seiner Länge wachsen lässt. Chondrozyten, die das proliferative Stadium als prähypertrophe Chondrozyten verlassen, werden unter ansteigendem Zellvolumen hypertroph und tragen so am stärksten zum Längenwachstum des Knochens bei (Hallett et al. 2019; Noonan et al. 1998). Prähypertrophe und hypertrophe Chondrozyten exprimieren PTH1R und IHH, das sowohl die Proliferation und enchondrale Differenzierung benachbarter Chondrozyten vorantreibt als auch die Differenzierung perichondrialer Zellen in Osteoblasten vermittelt und die PTHrP-Expression in den ruhenden Chondrozyten induziert. PTHrP wiederum hält die Chondrozyten in der proliferierenden Zone in einem proliferativen Zustand, verhindert deren vorzeitige hypertrophe Differenzierung und inhibiert die IHH-Expression (Lee et al. 1996; Vortkamp et al. 1996). IHH und PTHrP

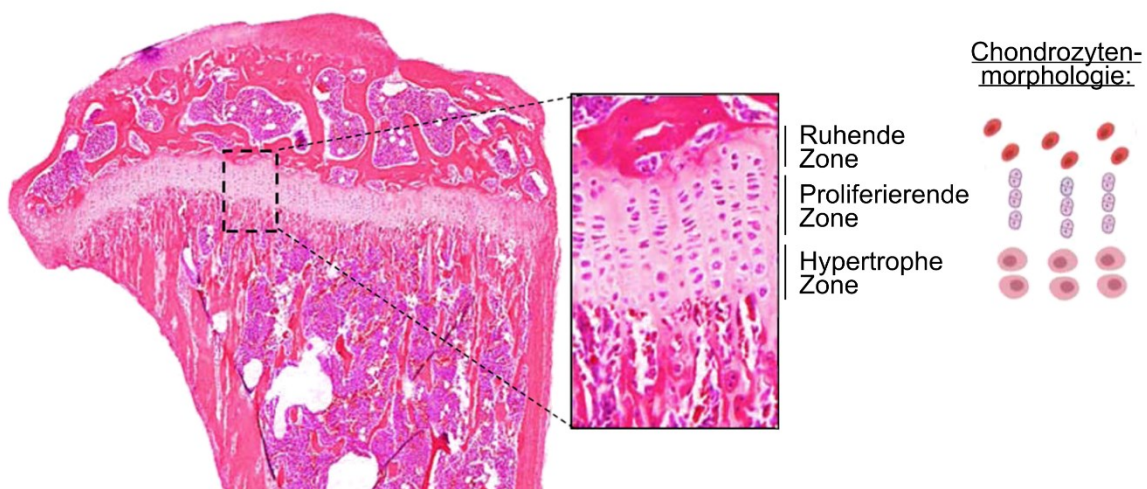


Abbildung 3: Darstellung der tibialen Wachstumsfuge adulter Mäuse nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die drei Zonen der Wachstumsfuge, die aus ruhenden, proliferierenden oder hypertrophen Chondrozyten bestehen. Abbildung modifiziert nach Dixit et al., 2020.

agieren somit in einer negativen Feedbackschleife, die die Geschwindigkeit der enchondralen Differenzierung reguliert und somit Wachstum und Ossifikationsprozesse in Balance hält. Zum Verbleib der hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumszone wird die Meinung, dass hypertrophe Chondrozyten apoptotisch werden und absterben (Silvestrini et al. 1998; Zenmyo et al. 1996), inzwischen durch Experimente zur Abstammungsverfolgung herausgefordert, die nahelegen, dass hypertrophe Chondrozyten zu Osteoblasten transdifferenzieren und somit zum Aufbau der Knochenmatrix beitragen können (Park et al. 2015; Yang et al. 2014a; Yang et al. 2014b; Zhou et al. 2014). Auch nach Mineralisierung der Wachstumsfuge und Erreichen der finalen Skelettgröße findet im Knochen durch das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoclasten, die Knochensubstanz abbauen, eine ständige Erneuerung der Knochenmatrix statt, um beispielsweise Mikroschäden auszugleichen (Hadjidakis und Androulakis 2006). Da eine derartige intrinsische Regenerationskapazität im Knorpel fehlt, sind betroffene Patienten mit Knorpeldefekten auf Therapien angewiesen, um das Risiko langfristiger Schäden am Bewegungsapparat zu minimieren.

1.1.3 Knorpeldefekte und zellbasierte Therapieansätze

Ein fünffach erhöhtes Arthroserisiko für Patienten mit unbehandelten, fokalen Knorpeldefekten unterstreicht die Relevanz erfolgreicher Knorpeltherapien (Gelber et al. 2000; Martel-Pelletier et al. 2016). Die frühesten Versuche, Knorpeldefekte zellbasiert durch *In-situ*-Regeneration zu heilen, gehen auf die 1950er Jahre zurück (Pridie 1959).

1.1.3.1 Mikrofrakturierung

Die Methode nach Pridie zielte auf die regenerative Kapazität von Knochenmark ab und hielt nach einigen Adaptationen unter der Bezeichnung *Mikrofrakturierung* Ende der 1990er Jahre Einzug in den klinischen Therapiealltag (Steadman et al. 1999). Sie wird vor allem bei kleineren Knorpeldefekten bis zu einer Größe von 2,5 cm² eingesetzt. Im Verlauf des Eingriffes wird die subchondrale Knochenplatte nach Reinigung des Defekts perforiert, sodass mit dem entweichenden Knochenmark mesenchymale Vorläuferzellen und Wachstumsfaktoren in den Defekt fließen, die zum Aufbau von Reparaturgewebe beitragen. Neben ihrer anabolen Funktion besitzen diese Vorläuferzellen auch immunregulatorische Eigenschaften, die entzündliche Prozesse im Gelenk reduzieren und somit die Knorpelreparatur fördern können (Harrell et al. 2019). Obwohl die Methode der Mikrofrakturierung aufgrund geringer Kosten und begrenzten Aufwandes häufig angewendet wird, sind die Langzeiterfolge für die Reparatur des Knorpels gering (Solheim et al. 2018). Da sich das austretende Knochenmark vor allem durch Bewegung im gesamten Gelenk verteilt und zuweilen nicht im Defekt gehalten wird, bleibt das anabole und anti-inflammatorische Potential des Knochenmarks zum Großteil ungenutzt. Das entstehende Knorpelersatzgewebe besteht außerdem oftmals aus Faserknorpel, der hyalinem

Knorpel *in puncto* biomechanischer Kompetenz unterlegen ist. Die autologe matrixinduzierte Chondrogenese (AMIC) als Weiterentwicklung der Mikrofrakturierung beinhaltet das oberflächliche Schließen des Defekts durch eine Kollagenmembran, um das Knochenmark im Defekt zu konzentrieren und die mesenchymalen Vorläuferzellen zur chondrogenen Differenzierung zu stimulieren (Benthien und Behrens 2010). Alles in allem führt Mikrofrakturierung aber nur kurzzeitig zu einer Schmerzlinderung und aufgrund der schwachen biomechanischen Eigenschaften des erzeugten Faserknorpels sowie des Narbengewebes verschlechtert sich der therapeutische Erfolg mit der Zeit gravierend (Grottkau et al. 2022; Volz et al. 2017).

1.1.3.2 Autologe Chondrozyten Implantation (ACI)

Für Knorpeldefekte von mehr als 2,5 cm² Größe beruhen klinisch angewandte Zelltherapien für die Knorpelregeneration seit 1994 auf der Implantation artikulärer Chondrozyten (ACI; Brittberg et al. 1994). Um patienteneigene artikuläre Chondrozyten zu isolieren, wird gesundes Knorpelgewebe aus einem nicht-gewichttragenden Bereich des Gelenks entnommen und enzymatisch verdaut, um die Zellen aus der sie umgebenden EZM zu lösen. Da artikulärer Knorpel nur in begrenztem Maße entnommen werden kann, ohne die Integrität des Gelenks zu gefährden, können aus einer Biopsie nur wenige Chondrozyten gewonnen werden. Deswegen ist eine etwa dreiwöchige *In-vitro*-Expansion der Knorpelzellen nötig, um eine ausreichend hohe Zellzahl für die Defektbehandlung zu erhalten. Anschließend werden die Zellen in einer zweiten Operation in den Knorpeldefekt transferiert. Als Weiterentwicklung der ACI entstand die Matrix-assoziierte Chondrozyten-Implantation, bei der ein Kollagen Typ I/III-Trägermaterial mit expandierten autologen Chondrozyten besiedelt und nach mehrtägiger *In-vitro*-Vorkultur in einen bestehenden Knorpeldefekt transplantiert wird (Behrens et al. 2006). Obwohl ACI-basierte Verfahren in Langzeitstudien bis 20 Jahre nach Behandlung die Symptome des Patienten durchaus verbesserten (Peterson et al. 2010), bringt die Verwendung von AC für die Behandlung von Knorpeldefekten drei wesentliche Nachteile mit sich. Erstens müssen sich Patienten zwei separaten kostspieligen Eingriffen unterziehen, die oft in einer offenen Gelenk-Operation durchgeführt werden und deren Nachwirkungen zeit- und schmerzintensiv sein können. Zweitens resultiert die Entnahme von intaktem Knorpelgewebe für die Isolation von AC in einem neuen Defekt, der aufgrund der fehlenden intrinsischen Regenerationsfähigkeit von Knorpel nicht heilt. So kann auch dieser neu gesetzte Defekt zur Morbidität des umgebenden Gewebes und langfristig zur Entwicklung von Arthrose führen (Gelber et al. 2000; Lee et al. 2000; Martel-Pelletier et al. 2016). Ein dritter gravierender Nachteil der Verwendung von AC stellt die *In-vitro*-Expansion dar, die notwendig ist um eine ausreichend hohe Zellzahl für die Defektbehandlung zu erreichen. Wiederholte Zellteilungen in künstlicher, nicht-nativer Umgebung während der AC-Expansion *in vitro* führen zu einem stetigen Verlust des Chondrozytenphänotyps, was durch chondrogene Stimulation *in vitro* nur teilweise umkehrbar ist und als

Redifferenzierung bezeichnet wird (Caron et al. 2012). Neben morphologischen Änderungen hin zum Fibroblasten äußert sich die Dedifferenzierung von AC vor allem in der reduzierten Expression der knorpeltypischen Gene *COL2A1* und *ACAN*, während *COL1A1* ansteigt (Benz et al. 2002; Binette et al. 1998; Winter et al. 2003). Wenn dedifferenzierte Chondrozyten in einen Knorpeldefekt transferiert werden, ist das von ihnen aufgebaute Reparaturgewebe oftmals fibrös und dem nativen Gewebe somit biochemisch und mechanisch unterlegen (Peterson et al. 2003; Tins et al. 2005). Diese gravierenden Nachteile der ACI verdeutlichen, dass artikuläre Chondrozyten keine ideale Zellquelle für die Knorpelregeneration darstellen. Eine vielversprechende Alternative, um diese Limitierungen zu umgehen, stellen mesenchymale Stromazellen dar.

1.2 Mesenchymale Stromazellen als vielversprechende Zellalternative für die Reparatur artikulären Knorpels

Mesenchymale Stromazellen (engl. *mesenchymal stromal cells*, MSC) sind Vorläuferzellen mesodermaler Abstammung, die ohne irreversible Defekte zu verursachen aus postnatalen Geweben wie Knochenmark oder Fett isoliert werden können, wo sie zur Regeneration beschädigter Strukturen beitragen (da Silva Meirelles et al. 2006). MSC befinden sich an der Oberfläche von feinen, das Knochenmark durchziehenden Blutgefäßen, den Sinusoiden, und tragen zu deren Stabilisierung bei. Erstmals wurden diese Zellen aus Knochenmark von Meer-schweinchen isoliert und ursprünglich als fibroblastenartige, plastikadhärente Zellen mit hoher Proliferationskapazität beschrieben, deren dicht wachsende Kolonien von nur einer Zelle abstammen können (Friedenstein et al. 1970). Aufgrund ihres multipotenten Charakters, der eine Differenzierung dieser Zellen entlang mesenchymaler Entwicklungslinien wie der adipogenen, osteogenen und chondrogenen erlaubt (Ashton et al. 1980; Friedenstein 1976; Mackay et al. 1998; Owen und Friedenstein 1988; Pittenger et al. 1999; Yoo et al. 1998), wurden diese Zellen als mesenchymale Stammzellen bezeichnet (Caplan 1991). Laut Caplans Charakterisierung seien mesenchymale Stammzellen in der Lage, in sämtliche vom Mesoderm abstammenden Gewebe wie Knorpel, Knochen, Muskel, Fett, Dermis, Sehnen, Bänder oder Bindegewebszellen zu differenzieren. Da ein entsprechender Nachweis allerdings nicht erbracht worden ist (Bianco et al. 2008), werden diese Zellen nach starker Kritik inzwischen als *mesenchymale Stromazellen* bezeichnet und sollten ausschließlich als Vorläufer skelettaler Gewebe angesehen werden (Bianco et al. 2013). Die Minimalkriterien zur Identifizierung von MSC beinhalten Plastikadhärenz, die Expression von Oberflächenmarkern (CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD45⁻, CD34⁻, CD14/CD11⁻, CD79a/CD19⁻, HLA-DR⁻) und die Differenzierungskapazität in die adipogene, osteogene und chondrogene Richtung (Dominici et al. 2006). Da die gewählten Oberflächenmarker jedoch auch auf Bindegewebszellen zu finden sind und sich ihre

Expression im Laufe der MSC-Expansion ändern kann (Bianco et al. 2013), verbleibt die Plastikadhärenz als gängige Methode, um MSC zu charakterisieren.

Zu den Vorteilen, MSC statt AC für die Knorpelregeneration zu verwenden, gehört unter anderem, dass den Patienten Knochenmark unter minimalinvasiven Bedingungen beispielsweise mittels Punktion aus dem Hüftkamm entnommen werden kann, ohne irreparable Schädigungen des Spendergewebes hervorzurufen. Außerdem ermöglicht die im Vergleich zu AC höhere Proliferationskapazität von MSC, dass sie während der *In-vitro*-Expansion in kürzerer Zeit stärker vermehrt werden können, bis eine expansionsbedingte Beeinträchtigung des Differenzierungspotentials eintreten würde. In Summe stellen MSC somit eine attraktive Zellalternative für die Knorpelregeneration dar.

1.2.1 MSC-basiertes Tissue Engineering von Knorpelgewebe *in vitro*

Die Knorpelregeneration war eines der frühesten Felder des Tissue Engineerings (Vacanti et al. 1991). Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Gebiet, das die Prinzipien der Ingenieur- und Biowissenschaften verbindet, um mit Hilfe von geeigneten Zellen, bioaktiven Wachstumsfaktoren und unterstützenden Biomaterialien biologische Ersatzgewebe zu entwickeln, die die ursprüngliche Gewebefunktion wiederherstellen, erhalten oder verbessern (Langer und Vacanti 1993). Die angestrebten Charakteristika des Ersatzgewebes orientieren sich dabei an der anatomischen Struktur, den biomechanischen Eigenschaften und den physiologischen Funktionen des nativen Gewebes. Für hyalinen Knorpel hängen diese Eigenschaften primär von Kollagen Typ II und Proteoglykanen ab, was sie bei der Bewertung von Knorpel-Tissue-Engineering-Konstrukten zu entscheidenden Evaluierungskriterien macht.

1.2.2 Chondrogene Bedingungen für die *In-vitro*-Knorpelneogenese mit MSC

Gängige Differenzierungsprotokolle der *In-vitro*-Knorpelneogenese mit MSC basieren auf einer hochdichten Pelletkultur, die den Kondensationsschritt mesenchymaler Vorläuferzellen während der embryonalen Knorpelentwicklung imitiert. Die in den Zellpellets bestehende hohe Zelldichte und die dadurch ermöglichten Zell-Zell-Kontakte wurden in Studien mit Extremitätenknospen von Hühner- und Mäuseembryos *in vivo* und *in vitro* als ausschlaggebend für die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Chondrozyten nachgewiesen (Ahrens et al. 1977; Capdevila und Johnson 1998; Pizette und Niswander 2000; Umansky 1966). Neben der 3D-Kultur ist die Verwendung eines chondrogenen Mediums entscheidend, das die Differenzierung von MSC zu Chondrozyten induziert und unterstützt. Chondrogenes Medium ist klassischerweise serumfrei und setzt sich aus definierten Komponenten zusammen, wobei die wichtigsten Bestandteile TGF β , Insulin und Dexamethason sind (Johnstone et al. 1998; Puetzer et al. 2010; Yoo et al. 1998). Während TGF β als Chondroinduktor *in vitro* fungiert, verstärken

Insulin und Dexamethason die TGF β -induzierte chondrogene MSC-Differenzierung (Derfoul et al. 2006; Hara et al. 2016; Johnstone et al. 1998).

1.2.3 Enchondrale Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen

Die ersten Tage der chondrogenen MSC-Pelletkultur sind von einem hohen Zellverlust von bis zu 50% geprägt, der vermutlich durch die Anpassung von Einzelschichtkultur an die hochdichte 3D-Kultur ausgelöst wird (Fischer et al. 2018). Laut Daten einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe starten MSC aus der Expansion mit hoher Proliferationskapazität in die 3D-Kultur, bringen den Zellzyklus innerhalb weniger Tage zum Erliegen und beginnen zwischen Tag 10 und 14 erneut zu proliferieren. Mit Wiederaufnahme der Proliferation differenzieren MSC-basierte Prä-Chondroblasten zu Chondrozyten mit rundlicher Zellmorphologie (Dexheimer et al. 2012). Ähnlich zur *In-vitro*-Redifferenzierung von AC unter identischen Kulturbedingungen steigen während der 42-tägigen *In-vitro*-Chondrogenese von MSC die Expression der chondrogenen Marker *COL2A1* und *ACAN* (Sekiya et al. 2002; Winter et al. 2003) und im Verlauf ihrer Differenzierung sekretieren die Zellen eine knorpeltypische EZM, die reich ist an Kollagen Typ II und Proteoglykanen (Pelttari et al. 2006).

Anders als AC jedoch differenzieren MSC unter Zunahme ihres Zellvolumens in einen hypertrophen Chondrozytenphänotyp, was von der Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge bekannt ist. Mit fortschreitender enchondraler Differenzierung steigt die Expression unerwünschter hypertropher Marker wie *COL10A1*, *IHH* und *PTH1R* sowie des osteogenen Markers *IBSP* und die ALP-Aktivität. Diese Prozesse, die auch während der enchondralen Ossifikation *in vivo* ablaufen, können unter geeigneten Bedingungen die Mineralisierung in von MSC produziertem Knorpelgewebe induzieren. Da derartige Bedingungen durch einen niedrigen Phosphatgehalt *in vitro* nicht gegeben sind, werden Mineralisierungstendenzen in Knorpelpellets in der Regel durch ektope, subkutane Transplantation ins Tiermodell nachgewiesen. Vier Wochen nach ektoper Implantation in immundefiziente Mäuse sind MSC-basierte Knorpelpellets im Gegensatz zu AC-Pellets in der Regel mineralisiert und verknöchert (Pelttari et al. 2006). Dies verdeutlicht, dass AC während der *In-vitro*-Knorpelneogenese den chondralen Differenzierungsweg einschlagen, während MSC unter identischen Kulturbedingungen der enchondralen Richtung folgen. Obwohl effiziente Differenzierungsprotokolle entwickelt wurden, die *in vitro* zur Reduktion der Hypertrophie in chondrogen differenzierenden MSC führen, ist es trotz jahrzehntelanger Forschung bisher nicht gelungen, den hypertrophen Chondrozytenphänotyp in MSC vollständig zu unterdrücken. Um MSC *in vitro* in den eigentlich erwünschten AC-ähnlichen Chondrozytenphänotyp differenzieren zu können, ist es essentiell zu verstehen, inwiefern MSC und AC unterschiedlich auf identische *In-vitro*-Kulturbedingungen reagieren.

1.2.4 Relevante Signalwege für die enchondrale Differenzierung

Auf der Suche nach unterschiedlichen Antworten von MSC und AC auf identische Kulturbedingungen während der *In-vitro*-Knorpelneogenese wurden Signalwege untersucht, die auch in der embryonalen Knorpelentwicklung und enchondralen Ossifikation eine Rolle spielen.

1.2.4.1 Der TGF β -Signalweg

Die TGF β -Familie besteht aus den drei Liganden TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 3 und ist Teil der TGF β -Superfamilie, die auch Aktivine, BMPs und *growth/differentiation factors* (GDFs) umfasst. Die TGF β -Liganden werden als inaktive Proteinvorläufer translatiert, die durch Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken Dimere bilden (Ten Dijke und Arthur 2007). Neben dem eigentlichen, sogenannten „reifen“ TGF β -Homo- oder Heterodimer enthält das TGF β -Vorläuferprotein auch eine Pro-Region namens *latency-associated peptide* (LAP) (Daopin et al. 1992; Tzavlaki und Moustakas 2020). Nach ihrer Spaltung durch eine Endopeptidase bindet LAP an TGF β und hält es inaktiv. Im Golgi-Apparat wird der Komplex um das *latent TGF β binding protein* (LTBP) erweitert, was eine schnelle Sekretion und Verankerung in der EZM ermöglicht (Khalil 1999). Durch die Abspaltung von LAP liegt TGF β in seiner aktiven Form vor und bindet an einen der Typ II-Rezeptoren TGF β RII, ACVR1IA oder ACVR1IB, die durch Autophosphorylierung aktiviert werden und einen der drei TGF β -Typ-I-Rezeptoren *activin receptor like kinase 4* (ALK4), ALK5 (auch: TGF β RI) oder ALK7 rekrutiert (Thielen et al. 2019). Nach dessen Aktivierung erfolgt die kanonische Signalweiterleitung über *SMA and mothers against decapentaplegic homolog 2* oder *3* (SMAD2 oder SMAD3), die durch das Protein *SMAD anchor for receptor activation* (SARA) am Rezeptor verankert werden. Nach ihrer Phosphorylierung (im Folgenden als *p* abgekürzt) spalten sich pSMAD2 oder pSMAD3 von SARA ab und bilden einen Komplex mit SMAD4, das für die Translokation in den Nukleus sorgt, wo der SMAD-Komplex als Transkriptionsfaktor die Expression chondrogener Marker reguliert. In einem negativen Rückkopplungssystem agieren SMAD6 und SMAD7 als Inhibitoren des TGF β -Signalweges, indem sie die Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 blockieren (Hata et al. 1998; Nakao et al. 1997). TGF β ist in frühe Chondrogenese-relevante Prozesse involviert. In mesenchymalen Zellen aus Extremitätenansätzen des Hühnerembryos induziert TGF β *in vitro* die Expression von Fibronectin, Syndekan, Tenascin oder N-Cadherin, die an der Zellkondensation beteiligt sind (Chimal-Monroy und De Leon 2003; Leonard et al. 1991). Auf posttranslativ-ebener Ebene begünstigt TGF β laut Studien in ATDC5-Zellen und 3D-Kultur boviner AC die Proteininstabilität von SOX9 als wichtigstem chondrogenen Transkriptionsfaktor (Chavez et al. 2017; Coricor und Serra 2016). Wie in expandierten humanen MSC untersucht wurde, vermittelt durch TGF β aktiviertes SMAD3 im Nukleus die Komplexbildung von SOX9 und dessen Ko-Aktivatoren CREB-binding protein und p300, was die Transkription chondrogener Marker wie *COL2A1* und *ACAN* induziert (Furumatsu et al. 2005; Sekiya et al. 2000). Neben seiner

pro-chondrogenen Funktion wurde TGF β -Signaling in Chondrozyten auch als anti-hypertropher Effektor beschrieben. In den Wachstumsfugen von Mäusen erhöhte ein knorpelspezifischer *Smad2*-Knockout, globaler *Smad3*-Knockout oder ein daraus kombinierter Doppel-Knockout die *Ihh*-Expression in der hypertrophen Zone, was im Vergleich zu Kontrollmäusen auch die *Ihh*-Proteinspiegel in der ruhenden Zone erhöhte, sowie Kollagen-Typ-X-Protein in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten (Wang et al. 2016; Yang et al. 2001). In frühen enchondralen *In-vitro*-Kulturmodellen bestehend aus 3D-Pellets von Wachstumsfugen-Chondrozyten von Ratten bzw. Kaninchen oder Chondrozyten aus dem Sternum von Hühnerembryos reduzierte TGF β -Behandlung die *Col10a1*-, *Mmp13*-Genexpression, die ALP-Enzymaktivität oder als Maß für Mineralisierung die Kalzium-Ablagerung (Ballock et al. 1993; Kato et al. 1988). Während der *In-vitro*-Chondrogenese humaner MSC wurde eine selektiv antihypertrophe TGF β -Wirkung beschrieben, da die ALP-Aktivität deutlich anstieg, sobald die TGF β 1-Behandlung ausgesetzt wurde, während andere hypertrophe Marker wie *COL10A1* oder *IHH* leicht reduziert oder unverändert waren (Dreher et al. 2020).

1.2.4.2 Der BMP-Signalweg

Zur TGF β -Superfamilie gehören auch die 14 bekannten BMP-Liganden, die als Dimere vorliegen und jeweils an die Typ-II-Rezeptoren ACVR1IA, ACVR1IB oder BMPRII binden, was zur Heteromerbildung eines Typ-II-Rezeptors mit einem der vier Typ-I-Rezeptoren ALK1 (ACVRL1), ALK2 (ACVR1), ALK3 (BMPRIA) oder ALK6 (BMPRI6) führt (Heldin und Moustakas 2016; Thielen et al. 2019). Nach Phosphorylierung des Typ-I-Rezeptors durch den Liganden-aktivierten Typ-II-Rezeptor erfolgt die Signalweiterleitung über Phosphorylierung von SMAD1/5/9, die als Komplex mit SMAD4 in den Nukleus translozieren, wo sie die Transkription von Zielgenen regulieren (Sanchez-Duffhues et al. 2020). Während der Embryonalentwicklung spielen BMPs eine entscheidende Rolle bei der Kondensation von MSC und der Chondrozytenproliferation (Minina et al. 2002; Minina et al. 2001). Smad1/5/9-Signaling stimuliert in der embryonalen Knochenentwicklung von Mäusen die terminale Chondrozytendifferenzierung und den Knochenaufbau (Cao und Chen 2005). Auch während der TGF β -induzierten *In-vitro*-Chondrogenese humaner MSC wird SMAD1/5/9-Signaling über ALK1/2/3/6 aktiviert, was möglicherweise durch die zellautonome Expression von *BMP4* und *BMP7* vermittelt wird (Dexheimer et al. 2016; Hellingman et al. 2011). Der früheren Auffassung, dass BMP-induziertes pSMAD1/5/9-Signaling für die hypertrophe *In-vitro*-Differenzierung von MSC-basierten Chondrozyten verantwortlich sein könnte (Hellingman et al. 2011; Kronenberg 2003; Leijten et al. 2012; Pogue und Lyons 2006), widersprach zum einen die Beobachtung, dass die BMP-Signalwegaktivität in Form von pSMAD1/5/9-Proteinspiegeln sowohl während der *In-vitro*-Knorpelneogenese von MSC als auch AC reduziert wurde (Dexheimer et al. 2016). Zum anderen zeigen bisher unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe, dass BMP-vermittelte

ALK1/2/3/6-Aktivität eine eher untergeordnete Rolle für die MSC-Chondrogenese spielt und nur begrenzt zum pro-chondrogenen TGF β 1-Signal beiträgt (Diederichs, Dreher, Nüesch et al., in Bearbeitung), was die Hypothese einer rein pro-hypertrophen BMP-Funktion widerlegte.

1.2.4.3 Der FGF-Rezeptor-Signalweg

Der FGF-Signalweg, zu dem 22 Liganden (FGF1-22) in 6 Unterfamilien und 4 Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (FGFR1-4) gehören, reguliert zahlreiche zelluläre Funktionen wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben (Xie et al. 2020). Nachdem FGF-Liganden an einen inaktiven, monomeren FGFR gebunden haben, erfolgt Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors durch Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste an der intrazellulären Rezeptordomäne. Je nach Zellkontext werden verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden aktiviert, wobei der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg der prominenteste ist. RAF, MEK und ERK sind Kinasen, die durch Phosphorylierung eines Serin/Threonin- (RAF, ERK) oder Serin/Tyrosin/Threonin-Restes (MEK) das jeweils nachgeschaltete Protein aktivieren, was im Falle von ERK auch ein Transkriptionsfaktor sein kann. Das charakteristische Expressionsprofil von FGFs und den FGF-Rezeptoren während der Knochenentwicklung impliziert ihre kritische Rolle für die enchondrale Differenzierung von Chondrozyten. Kondensierende mesenchymale Vorläuferzellen exprimieren *Fgf2*, *Fgf4*, *Fgf7*, *Fgf8* und *Fgf9*, während mit zunehmender Differenzierung zu Chondrozyten und in der Wachstumsfuge hauptsächlich *Fgf2*, *Fgf8*, *Fgf9*, *Fgf18*, *Fgf21* und *Fgf23* zu finden sind (Crossley et al. 1996; Hung et al. 2007; Ohbayashi et al. 2002). In der ruhenden und proliferativen Zone der Wachstumsfuge konnten vornehmlich *Fgfr2*, *Fgfr3* und *Fgfr4* nachgewiesen werden, wohingegen *Fgfr1* zwar auch in der ruhenden, als einziger Fgf-Rezeptor jedoch auch in der hypertrophen Zone auftrat (Lazarus et al. 2007; Su et al. 2014). Globaler Knockout von *Fgf2*, *Fgf3* oder *Fgfr3* in der Maus inhibierte das skelettale Längenwachstum, was zu Zwergwuchs führte, und reduzierte die Knochenmineralisierung, während bei *Fgfr2*-Knockout-Mäusen die Ausbildung der Extremitätenknospen sogar vollständig aussetzte (Su et al. 2014). In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe reduzierte eine Behandlung mit FGF18 die GAG-Ablagerung während der *In-vitro*-Chondrogenese humaner MSC (Fischer et al. 2018). Dies stand im Einklang mit der beschriebenen Inhibition der Chondrozytendifferenzierung durch FGFR3/FGF18 in späten embryonalen oder postnatalen Wachstumsfugen von Mäusen, widersprach aber einer anderen *In-vitro*-Studie, in der FGF18-Behandlung die GAG/DNA-Ablagerung während der MSC-Chondrogenese erhöhte (Correa et al. 2015; Naski et al. 1998). Unter pharmakologischer FGFR-Inhibition während der MSC-Chondrogenese waren *COL2A1*, *COL10A1* sowie die ALP-Aktivität erhöht (Dreher et al. 2020), was zum einen darauf hinwies, dass chondrogen differenzierende MSC FGF-Liganden sekretierten, und zum anderen zeigte, dass eine Reduktion der FGFR-Aktivität die chondrogene Differenzierung beschleunigte. Dieser anti-chondrogene FGFR-Effekt stand im Einklang mit einer

Studie zu humanen AC, in der ERK durch Überexpression seiner vorgeschalteten Kinase MEK kontinuierlich aktiviert wurde, was zu reduzierten *ACAN*- und *SOX9*-Spiegeln und verringerter Proteoglykansynthese führte (Yin et al. 2009). Somit ist der FGF-Signalweg ein wichtiger Inhibitor der Differenzierungsgeschwindigkeit während der MSC-Chondrogenese *in vitro*.

1.2.4.4 Der WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg umfasst 19 WNT-Liganden sowie 15 Rezeptoren und Ko-Rezeptoren, wobei die 10 Frizzled (FZD)-Proteine als Hauptrezeptoren fungieren (Niehrs 2012). Der kanonische WNT-Signalweg ist abhängig vom Transkriptionsfaktor β -Catenin und wird durch das Binden von sekretierten WNT-Liganden an den FZD-Rezeptor initiiert. Die Rekrutierung eines der zwei Ko-Rezeptoren *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP)-5 oder -6 induziert Konformationsänderungen des nachgeschalteten Molekülkomplexes, der aus Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β), Axin, adenosomatosis polyposis coli (APC) und Casein-Kinase-1 α (CK1 α) besteht. Die so induzierte Unterdrückung der GSK3 β -vermittelten Phosphorylierung von β -Catenin führt zur Stabilisierung und nukleären Translokation von β -Catenin (Usami et al. 2016). Im Zellkern bindet β -Catenin Transkriptionsfaktoren wie *T-cell factor* (TCF) oder *lymphoid enhancing factor* (LEF), was die Transkription von Zielgenen aktiviert (Archbold et al. 2012). In Mausstudien mit konditionalem Knockout des β -Catenin-Gens *Ctnnb1* erwies sich der WNT-Signalweg als entscheidend für die Etablierung eines hypertrophen Chondrozytenphänotyps während der embryonalen Entwicklung der Gliedmaßen (Day et al. 2005; Enomoto-Iwamoto et al. 2002; Lu et al. 2013; Takegami et al. 2016). Neben dem kanonischen, β -Catenin-abhängigen WNT-Signalweg werden durch spezielle Kombinationen von WNT-Liganden und FRZ-Rezeptoren auch nicht-kanonische, β -Catenin-unabhängige Signalwege aktiviert (Niehrs 2012). Trotz steigender Expression nicht-kanonischer WNT-Signalwegkomponenten während der MSC-Chondrogenese (Diederichs et al. 2019) deuten unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe darauf hin, dass statt nicht-kanonischem eher kanonisches WNT-Signaling an der enchondralen MSC-Differenzierung beteiligt ist. Damit im Einklang schalteten chondrogen differenzierende MSC kanonisches WNT-Signaling, dargestellt als Proteinlevel von aktivem β -Catenin, im Verlauf der *In-vitro*-Knorpelneogenese langsamer ab als AC (Diederichs et al. 2019). Die Reduktion der WNT-Aktivität durch den Porcupine-Inhibitor IWP-2, der die Sekretion von WNT-Liganden aus der Zelle blockiert, führte bei unveränderten *COL2A1*-Spiegeln zu einer starken Abnahme der hypertrophen Marker *COL10A1*, *IHH* und *PTH1R* sowie des osteogenen Markers *IBSP* und der ALP-Aktivität (Diederichs et al. 2019). Diese starke Reduktion des hypertrophen Chondrozytenphänotyps durch IWP-2 identifizierte WNT für die MSC-Chondrogenese als einen pro-hypertrophen Signalweg.

Der Vergleich von Signalwegaktivitäten zwischen der enchondralen MSC-Differenzierung und chondralen AC-Redifferenzierung hat unser Verständnis von der Regulation des

Chondrozyten-phänotyps *in vitro* erheblich erweitert, indem Signale identifiziert wurden, durch deren Modulation der hypertrophe Phänotyp in chondrogen differenzierenden MSC reduziert werden kann.

1.2.5 Methoden zur Reduktion der Hypertrophie während der MSC-Chondrogenese

Für die Reduktion des hypertrophen Chondrozytenphänotyps während der MSC-Chondrogenese *in vitro* stehen aktuell zwei Ansätze zu Verfügung, die auf Modulation des WNT- oder PTHrP-Signalweges beruhen. Einen ersten vielversprechenden Ansatz zur Reduktion des hypertrophen Phänotyps während der MSC-Chondrogenese stellt die **WNT**-Inhibierung dar. Besonders aussichtsreich erschien diese Methode, weil der WNT-Signalweg neben seiner prohypertrophen Effekte in der Wachstumsfuge in Osteoblasten die IHH-Aktivität kontrolliert (Liu et al. 2008), die auch mit der Chondrozyten-Hypertrophie in der MSC-Chondrogenese *in vitro* assoziiert wird. Die Inhibition der kanonischen als auch nicht-kanonischen WNT-Aktivität durch IWP-2 während der MSC-Chondrogenese reduzierte den hypertrophen Phänotyp deutlich, ohne die chondrogene Differenzierung zu beeinträchtigen (Diederichs et al. 2019). Nach ektoper Transplantation ins Mausmodell waren Mineralisierung und Knochenbildung in IWP-2-behandelten Knorpelpellets jedoch nur reduziert und nicht vollständig unterdrückt (Diederichs et al. 2019). Folglich war es durch WNT-Inhibition trotz großer Fortschritte noch nicht gelungen, einen robusten Chondrozytenphänotyp zu induzieren, der sich wie in AC der Fall ohne weitere Inhibitorbehandlung *in vivo* selbst stabilisieren konnte.

Eine zweite effiziente *In-vitro*-Methode zur Reduktion der Hypertrophie in der MSC-Chondrogenese beruht auf der Manipulation des PTHrP-Signalweges. Als wichtiger Spieler der IHH/PTHrP-Feedbackschleife fördert **PTHrP** in der Wachstumsfuge einerseits die Proliferationsaktivität von Chondrozyten in der proliferierenden Zone und hemmt andererseits die IHH-induzierte hypertrophe Differenzierung (Mak et al. 2008; Vortkamp et al. 1996). Basierend auf der Beobachtung, dass AC während der 3D-Redifferenzierung PTHrP-Protein auf durchgängig hohem Niveau sekretierten, enchondral differenzierende MSC die PTHrP-Sekretion nach Tag 14 der 3D-Kultur jedoch reduzierten (Fischer et al. 2010), wurde intensiv an einer adäquaten PTHrP-Behandlung gearbeitet, um den hypertrophen Phänotyp während der chondrogenen MSC-Differenzierung zu reduzieren. Zunächst wurden MSC-Pellets von Tag 7 bis 42 der Chondrogenese konstant mit 2,5 nM PTHrP(1-34) behandelt, was die chondrogene Differenzierung stark inhibierte (Fischer et al. 2014; Weiss et al. 2010). In einem zweiten Ansatz wurde PTHrP drei Mal pro Woche als 6-stündiger Puls verabreicht. Unter dieser Behandlung war der hypertrophe Phänotyp leicht verringert, ohne die Chondrogenese zu beeinträchtigen (Fischer et al. 2014). Als weitere Anpassung der Behandlung wurde der 6-stündige PTHrP-Puls täglich verabreicht, was die Hypertrophie bei gleichbleibender EZM-Ablagerung stark reduzierte (Fischer et al. 2016). Trotz vielversprechender Resultate *in vitro* mineralisierten und verknöcherten diese Knorpelpellets nach ektoper Transplantation *in vivo* (Diederichs, Dreher, Nüesch

et al., Publikation in Vorbereitung), was darauf hindeutete, dass trotz aller Fortschritte kein stabiler, AC-ähnlicher Chondrozytenphänotyp induziert werden konnte.

Obwohl sowohl WNT-Inhibition als auch täglicher PTHrP-Puls effektive Ansätze darstellen, die Hypertrophie in chondrogen differenzierenden MSC zu reduzieren, ist es bisher nicht möglich, MSC *in vitro* vollständig zu einem AC-ähnlichen Chondrozytenphänotyp zu differenzieren. Dies verdeutlicht unser nach wie vor lückenhaftes Wissen über Regulatoren des Chondrozytenphänotyps *in vitro* und unterstreicht die Notwendigkeit, weitere Signalwege zu identifizieren, die an der enchondralen MSC-Differenzierung beteiligt sind.

1.3 Der IGF1/PI3K/AKT-Signalweg

Ein Signalweg, der im Kontext der enchondralen MSC-Differenzierung bisher noch nicht untersucht worden ist, ist der durch den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 1 (engl. *insulin-like growth factor 1*, IGF1) induzierte Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg¹. AKT, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, wurde 1977 als Onkogen in einer Mauslinie mit ausgeprägter Thymombildung identifiziert (Staal et al. 1977). Der Name AKT setzt sich aus dem Namen dieser Mauslinie, **AKR**, und dem Gewebe der Tumorbildung, dem **Thymus**, zusammen. Mit AKT1, AKT2 und AKT3 wurden insgesamt drei Proteinisoformen identifiziert, die von drei unterschiedlichen Genen codiert werden (Cheng et al. 1992; Nakatani et al. 1999; Staal et al. 1988). Die AKT-Proteine sind Kinasen, die nachgeschaltete Substrate an der Hydroxylgruppe von Serin- oder Threonin-Resten phosphorylieren, was sowohl zur Aktivierung als auch Inhibierung der so modifizierten Proteine führen kann. Eine AKT-Kinase besteht aus drei Domänen: einer Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne am N-Terminus des Proteins, einer zentralen Kinase-Domäne und einer regulatorischen Domäne am C-Terminus (Hanada et al. 2004). Die drei AKT-Isoformen unterscheiden sich vor allem in den PH- und regulatorischen Domänen, während die Kinase-Domänen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen (Martelli et al. 2012). Zu den beschriebenen Isoform-spezifischen AKT-Funktionen zählen Zellüberleben, Proliferation und Proteinsynthese für AKT1, Glukoseaufnahme von Zellen für AKT2 und neuronale Entwicklung für AKT3. Im Einklang damit ist für AKT1 und AKT2 eine globale Expression in zahlreichen Gewebetypen beschrieben, während AKT3 hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird (Hinz und Jücker 2019). Da alle drei Isoformen eine identische oder ähnliche Substratspezifität aufweisen (Walker et al. 1998), kann der Verlust einer Isoform durch die verbleibenden AKT-Varianten zellkontextabhängig kompensiert werden (Hers et al. 2011).

¹ Manche Aspekte der folgenden Einleitungsabschnitte sind in stark verkürzter Form in eine aus dieser Arbeit entstandene Erstautorpublikation eingeflossen (siehe Klampfleuthner et al. 2022).

1.3.1 Aktivierung und zellintrinsische Deaktivierung des PI3K/AKT-Signalweges

Die AKT-Aktivierung erfolgt über verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen an der Zellmembran, die durch das Binden spezifischer Liganden wie IGF1 an ihren jeweiligen Rezeptor aktiviert werden (Abbildung 4) (Hanada et al. 2004). Der IGF1-Rezeptor (IGF1R) beispielsweise besteht aus zwei identischen Monomeren, die jeweils eine extrazelluläre α -Untereinheit mit Liganden-Bindedomäne und eine Zellmembran-durchspannende β -Untereinheit mit Kinase-Domäne enthalten (LeRoith et al. 2021). Aufgrund einer hohen strukturellen Ähnlichkeit zwischen Insulin und IGF1, aber auch zwischen deren Rezeptoren, kann Insulin neben seinem eigenen Insulin-Rezeptor (IR) auch den IGF1R oder Hybridrezeptoren aus IR- und IGF1R-Untereinheiten binden (LeRoith et al. 2021). Trotz deutlich höherer Affinität von Insulin und IGF1 für die jeweils eigenen Rezeptoren ist die in typischen serumfreien Medien enthaltene Insulinkonzentration im $\mu\text{g/ml}$ -Bereich hoch genug, um auch den IGF1R zu aktivieren (Denley et al. 2005; Phornphutkul et al. 2006; Steele-Perkins et al. 1988). Nachdem IGF1 oder Insulin an die extrazelluläre α -Domäne des IGF1R binden, führt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins zur Autophosphorylierung eines Tyrosin-Restes an der β -Untereinheit, was die rezeptoreigene Kinase-Aktivität erhöht (Denley et al. 2005). Die Aktivierung dieser Kinase phosphoryliert eine Reihe von nachgeschalteten Proteinsubstraten, einschließlich der Insulinrezeptorsubstrate (IRS)-1 und IRS-2 (Danielpour und Song 2006), was wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung der PI3K führt. PI3K phosphoryliert daraufhin

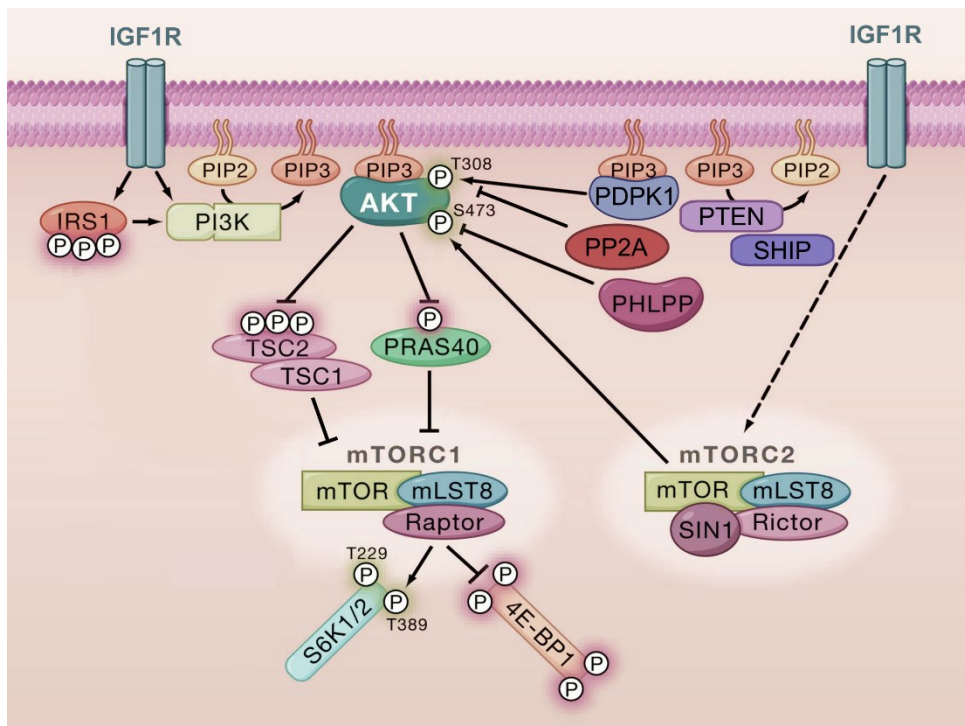


Abbildung 4: Schematische Übersicht über die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges am Beispiel des IGF1R. Modifiziert nach Manning & Cantley 2007.

Phosphatidylinositol(4,5)-biphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (PIP3), was die PIP3-Konzentration an der Zellmembran erhöht. Da die PH-Domäne der AKT-Kinasen eine hohe Bindeaffinität zu PIP3 aufweist, erhöht sich mit steigendem PIP3-Spiegel auch die Rekrutierungsrate von AKT an die Zellmembran, das in seiner inaktiven Form im Cytoplasma verteilt vorliegt (Manning und Toker 2017). Das Binden von AKT an PIP3 initiiert Konformationsänderungen, die die AKT-Phosphorylierung durch die Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (engl. *phosphoinositide-dependent protein kinase 1*, PDK1) an Threonin 308 (T308) der Kinase-Domäne und durch *mechanistic target of rapamycin complex 2* (mTORC2) an Serin 473 (S473) der regulatorischen Domäne ermöglichen. Die Aktivierung von mTORC2 ist bislang nicht eindeutig geklärt, scheint aber entweder direkt über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie IGF1R, die PI3K-vermittelte PIP3-Synthese oder in einer positiven Feedbackschleife durch AKT zu erfolgen (Thobe et al. 2017; Zhao et al. 2020). Neben zahlreichen weiteren Phosphorylierungsstellen des AKT-Proteins sind T308 und S473 essentiell, um AKT vollständig zu aktivieren. Abhängig vom Zellkontext phosphoryliert die aktive AKT-Kinase im Cytoplasma oder Zellkern nachgeschaltete Proteine. Bislang sind mehr als 100 AKT-Substrate unterschiedlicher Funktionen wie Protein- und Lipidkinasen, Transkriptionsfaktoren oder Regulatoren des Zellzyklus identifiziert worden (Manning und Cantley 2007). AKT ist beispielsweise an der Aktivierung von mTORC1 beteiligt, einem wichtigen Vermittler der Proteinsynthese (Bhaskar und Hay 2007). Da AKT-Kinasen in der Regel mehrere Substrate parallel phosphorylieren, folgt auf AKT-Aktivierung keine lineare, sondern eine stark verzweigte Signalweiterleitung. Die AKT-vermittelte simultane Aktivierung oder Inhibition seiner Substrate und der mit ihnen assoziierten Signalwege, die an vielfältigen Zellprozessen beteiligt sind, resultiert in einer hohen Komplexität des PI3K/AKT-Signalweges und einem breit gefächerten Repertoire AKT-abhängiger Effekte. Zusätzlich können unterschiedliche AKT-Induktoren zu einer unterschiedlichen Stärke und Dauer des AKT-Signals führen, was sich wiederum auf die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege und deren Effekte auswirken kann. Selbst eine marginale Veränderung der AKT-Aktivierung durch verschiedene Liganden, die sich beispielsweise in schwächerer Aktivierung des einen und stärkerer Inhibition eines anderen AKT-abhängigen Signalweges äußert, kann eine Zellantwort auf scheinbar ähnliche extrazelluläre Stimuli grundlegend verändern. Um die AKT-Signalwegaktivität auf die dynamischen Anforderungen einer Zelle abzustimmen, existieren mehrere intrazelluläre Optionen der AKT-Inhibition. Durch die Phosphatasen *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) oder *SH2-domain-containing inositol 5'-phosphatase* (SHIP) beispielsweise wird PIP3 zu unterschiedlichen PIP2-Varianten dephosphoryliert (PTEN: PI(4,5)P2, SHIP: PI(3,4)P2) (Hinz und Jücker 2019), was die PIP3-Konzentration an der Zellmembran und somit die Rekrutierung und Aktivierung von AKT reduziert. Eine weitere Option, AKT-Aktivität zu inhibieren, stellen direkte AKT-Phosphatasen dar. Während die Proteinphosphatase 2A (PP2A) AKT an T308 dephosphoryliert, entfernen die *PH domain leucine-rich repeat protein phosphatases 1* und 2 (PHLPP1 and PHLPP2) die AKT-Phosphorylierung

an S473, was ebenfalls zur Deaktivierung der AKT-Kinase führt (Hinz und Jücker 2019; Manning und Toker 2017). Inhibition des AKT-Signalweges findet auch durch posttranslationale Modifikationen statt, wie zum Beispiel durch Acetylierung in der PH-Domäne von AKT zur Hemmung der PIP3-Bindung, Glykosylierung in der Kinase-Domäne zur Reduktion der AKT-Substratphosphorylierung oder Ubiquitinierung zur Induktion der Proteasom-vermittelten Degradation (Chan et al. 2014; Sundaresan et al. 2011; Wang et al. 2012). Die Vielzahl an unterschiedlichen Optionen der AKT-Inhibition verdeutlicht, dass das Abschalten des AKT-Signalweges für die Funktionalität einer Zelle und das Überleben eines Organismus genauso wichtig ist wie dessen Aktivierung. So ist AKT-Überstimulation mit unkontrolliertem Zellwachstum bis hin zu extremer Überwucherung und erhöhter Tumoranfälligkeit verschiedener Gewebe assoziiert, dem eine betroffene Zelle mit Induktion apoptotischer Prozesse entgegentreten kann (Los et al. 2009). Da der AKT-Signalweg je nach Zellkontext vielfältige zelluläre Prozesse wie Zellüberleben, Proliferation und Differenzierung kontrolliert, ist es nicht überraschend, dass er als wichtiger Knotenpunkt des zellulären Signalnetzwerkes von vielen anderen Signalwegen aktiviert werden kann.

1.3.2 Externe und endogene AKT-Agonisten während der MSC-Chondrogenese *in vitro*

In Abwesenheit von Serum als IGF1-Quelle ist Insulin im klassischen chondrogenen Differenzierungsmedium der wichtigste pAKT-Induktor. Zusätzlich wurden auch andere Chondrogenese-relevante Signalmoleküle als potentielle AKT-Agonisten beschrieben. In Monolayer-Kulturen humaner AC, humaner Krebszelllinien oder perichondrialer Mesenchymzellen neonataler Mäuse erhöhte Behandlung mit **TGF β** , das im chondrogenen Medium als Chondroinduktor in hohen Dosen eingesetzt wird, zwischen 1 und 15 ng/ml für bis zu 60 Minuten die pAKT-Proteinspiegel (Cheng et al. 2014; Qureshi et al. 2007; Walker et al. 2013). In humanen Muskelzellen hingegen waren die pAKT-Spiegel nach 3-tägiger Behandlung mit 1 ng/ml TGF β 1 reduziert (Trendelenburg et al. 2009). Die Modulation der AKT-Aktivität durch TGF β war somit stark zellkontextabhängig. Liganden des **BMP**-Signalweges wie BMP4 und BMP7, deren Expression während der MSC-Chondrogenese anstieg (Dexheimer et al. 2016), erhöhten in einer humanen Chondrosarkom-Zelllinie, der Mausmyoblasten-Zelllinie C2C12 oder Stammzellen aus Mäuseembryos die pAKT-Spiegel nach bis zu 120-minütiger Behandlung mit Konzentrationen zwischen 10 und 100 ng/ml (Boergermann et al. 2010; Chattopadhyay et al. 2017; Chen et al. 2014; Kang et al. 2011; Lee et al. 2009b). Außerdem reduzierte Überexpression des BMP-Zielgens *inhibitor of differentiation 1 (ID1)* in humanen Krebszelllinien die Transkription des AKT-Inhibitors *PTEN*, was einen weiteren Mechanismus zur AKT-Aktivierung durch BMP darstellte (Lee et al. 2009a). Auch der **FGFR**, dessen Aktivität die Geschwindigkeit der chondrogenen MSC-Differenzierung *in vitro* reguliert (Dreher et al. 2020), gilt als häufiger AKT-

Induktor (Mossahebi-Mohammadi et al. 2020; Su et al. 2014; Xie et al. 2020). In *In-vitro*-Experimenten mit humanen Krebszelllinien steigerte die Behandlung mit 10 ng/ml FGF2 die pAKT-Proteinspiegel (Quan et al. 2020; Turner und Grose 2010). Neben TGF β -, BMP- und FGFR-Signaling wurden auch kanonischen **WNT**-Liganden wie Wnt3a AKT-aktivierende Effekte zugesprochen. In humanen Trophoblastenzellen und Fibroblasten- oder Pankreas-Zelllinien von Mäusen führte die Behandlung mit 100 - 150 ng/ml Wnt3a zu einer transienten AKT-Aktivierung innerhalb von 5 bis 30 Minuten (Gui et al. 2013; Kim et al. 2007; Sonderegger et al. 2010). Auch nicht-kanonische Liganden wie Wnt5a wurden als AKT-Induktoren beschrieben. In einem Hyaluronsäure-Hydrogel, das mit humanen MSC und einem Wnt5a-Mimetic beladen war, waren die pAKT-Proteinspiegel nach 7 Tagen *In-vitro*-Chondrogenese im Vergleich zur Wnt5a-freien Kontrolle erhöht (Deng et al. 2022). Des Weiteren waren die pAKT-Level in Stimulationsexperimenten mit Wnt5a in Monolayer-Kulturen humaner AC sowie einer humanen Magenkrebs-Zelllinie oder nach Wnt11-Überexpression in der Hamsterzelllinie CHO im Vergleich zu Kontrollen erhöht (Huang et al. 2017; Liu et al. 2013; Railo et al. 2008). Obwohl der AKT-Signalweg während der *In-vitro*-Knorpelneogenese mit MSC kontinuierlich durch Insulin induziert wird und möglicherweise auch von anderen Chondrogenese-relevanten Signalmolekülen moduliert werden könnte, ist bisher überraschenderweise nicht bekannt, welche Rolle die AKT-Aktivierung für die MSC-Chondrogenese spielt.

1.3.3 Pro-chondrogene Funktion des IGF1/AKT-Signalweges

Erste indirekte Hinweise auf eine ubiquitäre Funktion des IGF1/AKT-Signalweges ergab die Expressionsanalyse von *Igf1* und *Igf1r* während der embryonalen Entwicklung. Da *Igf1* und *Igf1r* während aller Stadien der humanen, bovinen und ovinen Embryonalentwicklung, also von frühen undifferenzierten Mehrzellstadien bis hin zu ausdifferenzierten fetalen Geweben, detektiert wurden (Lighten et al. 1997; Watson et al. 1992; Watson et al. 1994; Zhang et al. 1994), wurde der IGF/AKT-Signalweg zunächst als für die gesamte embryonale Differenzierung relevant angesehen, ohne dass eine spezifischere Einordnung seiner Funktion möglich gewesen wäre. In darauffolgenden Studien zur Morphogenese der knorpeligen Extremitäten im Mäuse- oder Hühnerembryo wurden *Igf1*- und *Igf1r*-Expression in kondensierenden mesenchymalen Zellen und Chondrozyten-Vorläufern nachgewiesen (McQueeney und Dealy 2001; van Kleffens et al. 1998; Wang et al. 1995), was eine potentielle chondroinduktive Funktion des IGF/AKT-Signalweges unterstützen würde.

Darauffolgende Knockout-Studien untersuchten die Rolle von AKT-Signalwegkomponenten für die Chondrozytendifferenzierung und Integrität der Wachstumsfuge. In Mäusen mit Defizienz von *Igf1*, *Igf1r*, *Ir* oder Einzel- bzw. Doppel-Knockout von *Akt1/2* wurde keine reduzierte Expression chondrogener Marker oder eine Beeinträchtigung von Proteoglykan- oder Kollagen-Typ-II-Ablagerung beobachtet (Heilig et al. 2016; Louvi et al. 1997; Peng et al. 2003; Ulici et al. 2009; Wang et al. 2011). Damit einhergehend ergaben Stimulationsstudien in

Ratten, deren Hypophyse zur Minimierung von Effekten durch endogene Signalmoleküle entfernt wurde, dass kontinuierliche IGF1-Injektion mittels subkutan platzierter, osmotischer Minipumpen keinen Effekt auf die EZM-Produktion pro Zelle hatte (Hunziker et al. 1994). Auf Grundlage dieser Knockout-Studien blieb somit festzuhalten, dass IGF/AKT *in vivo* keine pro-chondrogene Funktion erfüllte.

Im Gegensatz dazu ist für isolierte Chondrozyten und Knorpelimplantate in serum-freier *In-vitro*-Kultur bekannt, dass IGF1- oder Insulinbehandlung entscheidend für die Expression chondrogener Marker ist und die EZM-Ablagerung steigert (Bhaumick und Bala 1991; Chubinskaya et al. 2008; Cigan et al. 2013; Luyten et al. 1988; Maor et al. 1993; Osborn et al. 1989; Yaeger et al. 1997). Darüber hinaus zeigten Überexpressions- und Inhibitorstudien, dass der PI3K/AKT-Signalweg die Proteoglykan- und Typ-II-Kollagenablagerung sowie die Expression von ACAN und SOX9 in 3D-Alginat- oder Monolayer-Kultur humaner AC, sowie Rinder-AC und Nucleus-pulposus-Zellen von Ratten stimulierte (Ahmed et al. 2014; Cheng et al. 2009; Starkman et al. 2005; Yin et al. 2009). Diese unterschiedlichen Effekte des PI3K/AKT-Signalweges *in vivo* und *in vitro* legten nahe, dass die Rolle von AKT für die Knorpelablagerung kontextabhängig sein könnte.

1.3.4 Bedeutung von AKT für den hypertrophen Chondrozytenphänotyp

Ob der PI3K/AKT-Signalweg auch pro-hypertroph wirken könnte, wurde in einer Vielzahl von Tierentwicklungsstudien untersucht. Der Knockout von *Igf1* oder *Igf1r* oder der kombinierte Knockout von *Akt1* und *Akt2* in Mäusen beeinträchtigte die hypertrophe Zone der Wachstumsfuge in hohem Maße, sodass diese in der Länge reduziert war und morphologisch weniger hypertrophe, also kleinere, Chondrozyten enthielt (Cooper et al. 2013; Peng et al. 2003; Ulici et al. 2009; Wang et al. 1999). Diese Beeinträchtigung führte letztendlich zu verzögerter Ossifikation, reduzierter Skelettmineralisierung und einer verringerten Knochenlänge (Baker et al. 1993; Heilig et al. 2016; Liu et al. 1993; Peng et al. 2003; Wang et al. 2011; Wang et al. 2006). Im Gegensatz dazu verlängerte Stimulation mit IGF1 oder Insulin die hypertrophe Zone und verstärkte die Ausprägung des hypertrophen Chondrozytenphänotyps in explantierten, embryonalen Mittelfußknochen von Maus oder Ratte und in Tibiae junger Kaninchen während der frühen postnatalen Skelettentwicklung (Abbaspour et al. 2008; Mushtaq et al. 2004; Phornphutkul et al. 2008; Phornphutkul et al. 2006). Stimulation mit IGF1 oder Insulin erhöhte außerdem die Expression von *Ihh*, *Col10a1* und anderen hypertrophen Markern in Monolayer-Kulturen von Chondrozyten, die aus der tibialen Wachstumsfuge von Hühnern isoliert worden waren, und einer chondrogenen Rattenzelllinie (Choukair et al. 2014; Ciarmatori et al. 2007; Leach et al. 2007). Angesichts solch starker Belege erscheint es wichtig, eine mögliche pro-hypertrophe Rolle des PI3K/AKT-Signalweges auch während der MSC-Chondrogenese *in vitro* in Betracht zu ziehen.

Für die *In-vitro*-Osteogenese humaner MSC wurde interessanterweise gezeigt, dass die ALP-Aktivität, Osteopontin-Protein und andere Marker, die Osteozyten mit hypertrophen Chondrozyten gemein haben, unter AKT-Inhibition reduziert waren (Baker et al. 2015; Xia et al. 2019; Ye et al. 2019; Zhang et al. 2016). Dies zeigte, dass die osteogene MSC-Differenzierung von PI3K/AKT-Aktivität abhängig war. Zusammenfassend deutet die Literatur auf eine pro-chondrogene IGF/AKT-Funktion *in vitro*, aber nicht *in vivo* hin. Eine pro-hypertrophe Rolle von AKT ist vor allem *in vivo* evident und auch in einigen *In-vitro*-Systemen beschrieben worden. Als bisher einzige Erkenntnis zur Funktion von AKT in der *In-vitro*-Chondrogenese humaner MSC wies unsere Arbeitsgruppe in einer früheren Studie nach, dass die PI3K/AKT-Aktivität nur in der frühen Phase der chondrogenen Differenzierung entscheidend zur Zellproliferation beitrug, in der späten Phase aber nicht mehr, wobei Proliferation wiederum maßgeblich war für eine korrekt ablaufende Chondrogenese und die Ablagerung von Kollagen Typ II (Dexheimer et al. 2012; Fischer et al. 2018). Ob der AKT-Signalweg auch in der späten Phase der MSC-Chondrogenese von Bedeutung ist und ob er als pro-chondrogener Signalweg die Geschwindigkeit der chondrogenen MSC-Differenzierung reguliert oder als pro-hypertropher Signalweg die Etablierung eines hypertrophen Chondrozytenphänotyps begünstigt, bleibt bislang jedoch ungeklärt.

1.4 Zielsetzung

Die Verwendung von MSC für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe ist durch ihre enchondrale Entwicklung in einen hypertrophen Chondrozytenphänotyp limitiert, der aus der Wachstumsfuge bekannt ist. Um MSC chondral zu einem AC-ähnlichen Phänotyp differenzieren zu können, müssen Signalwege identifiziert werden, die für diese enchondrale statt chondrale Chondrozytendifferenzierung verantwortlich sein könnten. Ein Signalweg, der in diesem Kontext bisher noch nicht untersucht worden ist, ist der PI3K/AKT-Signalweg. Während er in der Wachstumsfuge als pro-hypertropher Signalweg an der Chondrozyten-Hypertrophie und Knochenbildung beteiligt ist, ist der PI3K/AKT-Signalweg *in vitro* essentiell für die Knorpelbildung von Chondrozytenkulturen und hat somit eine pro-chondrogene Funktion. Obwohl AKT während der MSC-Chondrogenese *in vitro* durch die kontinuierliche Behandlung mit Insulin unablässig aktiviert wird, ist bisher überraschenderweise nicht geklärt, welche Rolle der PI3K/AKT-Signalweg für die enchondrale Differenzierung von MSC spielt.

Das Ziel dieser Studie war es daher zunächst herauszufinden, ob der AKT-Signalweg während der enchondralen bzw. chondralen Chondrozytendifferenzierung gleich stark auf externe Stimulation reagiert und ob Chondrogenese-relevanten Signalwege die AKT-Aktivierung während der MSC-Chondrogenese regulieren. Des Weiteren sollte die Rolle des PI3K-AKT-Signalweges aufgeklärt werden, wobei der Fokus besonders auf einer putativen pro-chondrogenen versus pro-hypertrophen Funktion lag. Um dies zu erreichen wurde die AKT-Aktivierung während der MSC-Chondrogenese mit derjenigen der AC-Redifferenzierung verglichen und Signalwege, die die Geschwindigkeit der Chondrogenese regulieren (TGF β , BMP, FGFR), bzw. der pro-hypertrophe WNT-Signalweg durch Entzug von Agonisten oder Zugabe von Inhibitoren moduliert. Um die PI3K/AKT-Funktion zu klassifizieren, wurden die Effekte von AKT-Stimulation bzw. -Inhibition auf chondrogene Marker, Proteoglykanablagerung sowie hypertrophe und osteogene Marker untersucht.

Diese Studie klärt auf, welche Differenzierungsprozesse während der MSC-Chondrogenese PI3K/AKT-abhängig sind, was wesentlich dazu beitragen wird, Differenzierungsprotokolle zu entwickeln, um MSC zu einem AC-ähnlichen und damit nicht-hypertrophen Chondrozytenphänotyp zu differenzieren, der uneingeschränkt für die klinische Knorpelregeneration einsetzbar ist.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Absolute QPCR SYBR Green Mix, (2x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Alizarin rot S	Chroma (Münster)
Ammoniumpersulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aquatex	Merck (Darmstadt)
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Borsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Certistain Fast Green FCF	Merck (Darmstadt)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)
Chondroitin-6-sulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (dNTPs)	PeqLab (Erlangen)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNA Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Eosin	Chroma (Münster)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ficoll™ Paque Plus	Cytiva (Schweden)
Gelatine aus Schweinehaut, Typ A	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (100 ng/ μl)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Glutamin (L-Glutamin)	Gibco/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe)

Materialien

Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Hämalaun nach Mayer (sauer)	Chroma (Münster)
ImmPact Vector Red Substrate Kit	Vector Laboratories (USA)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
IWP-2	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	AppliChem (Darmstadt)
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Applied Science (Basel, CH)
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka/Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natrium-Selenit	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natronhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Neo-Mount	Merck (Darmstadt)
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Gibco/Life Technologies
Oligo(dT) Primer	Eurofins Genomics (Ebersberg)
p-Nitrophenol Standard (10 mM)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Paraffin Paraplast X-Tra®	Leica Biosystems (Nussloch)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Pefabloc®	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Penicillin/Streptomycin [100 U/ml]	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)
peqGOLD TriFast	PeqLab/VWR (Erlangen)
peqGreen DNA/RNA Farbstoff	PeqLab/VWR (Erlangen)
PhosphoSafe™ Extraktionsreagenz	Merck (Darmstadt)
Ponceau Rot S	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Precision Plus ProteinStandards™ DualColor	Bio-Rad (Hercules, USA)
Primer Eurofins MWG	Eurofins MWG Operon (Huntsville, USA)
Prolin (L-Prolin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Restore™ PLUS Stripping Solution	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNaseOut™ Ribonuclease Inhibitor, 40 U/μl	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Roti® Histol	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese® 30 Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
Safranin Orange (Safranin O)	Chroma (Münster)

Salzsäure (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Bio-Rad (Herules, USA)
Transferrin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trifast	VWR (Erlangen)
Tris Base	Merck (Darmstadt)
Trishydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trizol	ambion/Life Technologies (Carlsbad)
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin/EDTA	Biochrom/Merck (Darmstadt)
Türksche Lösung	Merck (Darmstadt)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
UltraPure destilliertes Wasser	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad)
WesternBright Quantum HRP Substrat	Advansta (San Jose, USA)

2.2 Wachstumsfaktoren, Hormone und Enzyme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
BMP4	R&D Systems, Bio-Techne (Wiesbaden)
BMP7	R&D Systems, Bio-Techne (Wiesbaden)
Dexamethason	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FGF2	Active Bioscience (Hamburg)
Hyaluronidase aus Rindertestes	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
IGF1	R&D Systems, Bio-Techne (Wiesbaden)
Insulin	Sanofi-Aventis (Frankfurt am Main)
ITS ⁺ Premix	Corning Life Sciences (New York City, USA)
Kollagenase B aus <i>C. histolyticum</i>	Roche Applied Science (Basel, CH)
LR3-IGF	R&D Systems, Bio-Techne (Wiesbaden)
Pronase	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Proteinase K > 600 U/mL	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RNaseOut™ Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)
Taq DNA Polymerase, rekombinant	Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, USA)
TGFβ1	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach), Biomol (Hamburg)
Trypsin/EDTA 10x (0,5%/0,2%)	Merck (Darmstadt)

2.3 Inhibitoren

Bezeichnung

IWP-2

LDN-212854

LY294002

Hersteller

Tocris Bioscience (Bristol, UK)

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Tocris Bioscience (Bristol, UK)

2.4 Antikörper

2.4.1 *Histologie*

Bezeichnung

Anti-human Kollagen Typ II (II-4CII) aus
Maus, monoklonal, Cat. 8631712
BrightVision Poly-AP-Anti Ms/Rb/Ra aus
Ziege, Cat. DPVO55AP

Hersteller

MP Biomedicals (Santa Ana, USA)

Immunologic (Duiven, NL)

2.4.2 *Westernblot*

Bezeichnung

Anti- β -Aktin (AC-15) aus Maus,
monoklonal, Cat. GTX26276
Anti-phospho-AKT (Ser473) aus Kaninchen,
polyklonal, Cat. 9271
Anti-AKT aus Kaninchen,
polyklonal, Cat. 9272
Anti-BSPII (IBSP, LFMb-24) aus Maus,
monoklonal, Cat. Sc-73634
Anti-phospho-SMAD1/5/9 aus Kaninchen,
monoklonal, Cat. 13820
Anti-SOX9 aus Kaninchen,
polyklonal, Cat. Ab5535
Anti-SMAD1 aus Kaninchen,
monoklonal, Cat. Ab33902
Anti-SMAD5 aus Kaninchen,
monoklonal, Cat. Ab40771
Anti-phospho-SMAD2/3 aus Kaninchen,
monoklonal, Cat. 3108
Anti-SMAD2 aus Kaninchen, monoklonal,

Hersteller

GeneTex (Irvine, USA)
Cell Signaling Technologies (Danvers, USA)
Cell Signaling Technologies (Danvers, USA)
Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, USA)
Cell Signaling (Danvers, USA)
Merck (Darmstadt)
abcam (Berlin)
abcam (Berlin)
Cell Signaling (Danvers, USA)
Cell Signaling (Danvers, USA)

Cat. 8685	
Anti-Kaninchen HRP aus Ziege, polyklonal, Cat. 111-035-046	Jackson ImmunoRes. (West Grove, USA)
Anti-Maus HRP aus Ziege, polyklonal, Cat. 115-035-071	Jackson ImmunoRes. (West Grove, USA)
Anti-Ziege HRP aus Rind, polyklonal, Cat. 805-035-180	Jackson ImmunoRes. (West Grove, USA)

2.5 Kits

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Omniscript RT Kit (dNTP Mix 5 mM, RT Puffer 10x)	Qiagen (Hilden)

2.6 Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® Ultra	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membran	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
Dermatril® P	KCL GmbH (Eichenzell)
Einfrierbox (Mr. Frosty)	Nalgene (Waltham, USA)
Einmalskalpelle	Feather (Osaka, JP)
Einweg-Pipetten (5/10/25 ml)	Falcon® Corning (Durham, USA)
Entsorgungsbeutel Brand	Neolab (Heidelberg)
Filterpapier Whatman 3 mm	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
Flachbodenplatte 6- und 24-well	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Flachbodenplatte 96-well, schwarz	Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)
Kanülen	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Kryoröhrchen	Simport (Saint-Mathieu-de-Beloeil, CAN)
Laborhandschuhe	Peha-Soft Hartmann (Heidenheim)
LightCycler 8 Tube-Streifen	Roche Applied Science (Basel, CH)
LightCycler 96-Well-Platte, flach	Roche Applied Science (Basel, CH)
Mikrotomklingen A35, N35	Feather (Osaka, JP)
Nylonsieb (40 µm)	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)

Materialien

Polytronröhrchen	Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (15/50 ml)	Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)
Reaktionsgefäße, RNase-frei (0,5/1,5/2 ml)	Steinbrenner Laborsysteme (Wiesenbach)
Rundbodenplatte 96-well	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Steritop Express™ Plus (0,22 µm)	Merck (Darmstadt)
TouchNTuff® Robust Nitril	Ansell (Brüssel, BE)
TissueCut® Microtome Blade	Medite (Burgdorf)
Zellkulturflaschen Cellstar T25, T75, T175	Greiner Bio One (Kremsmünster, AT)
Zellschaber	Neolab (Heidelberg)

2.7 Primer

Tabelle 1: Primersequenzen, Annealingtemperaturen (T) und Produktgrößen

Gen	<i>Forward</i> -Sequenz (5'-3')	<i>Reverse</i> -Sequenz (5'-3')	T [°C]	Produktgröße
<i>ACAN</i>	GGAACCACTTGGGTCACG	GCACATGCCTTCTGCTT	58	117 bp
<i>ALPL</i>	CACCAACGTGGCTAAGAATG	ATCTCCAGCCTGGTCTCCTC	58	126 bp
<i>COL2A1</i>	TGGCCTGAGACAGCATGAC	AGTGTTGGGAGCCAGATTGT	58	373 bp
<i>COL10A1</i>	TTTACGCTGAACGATACCAAA	TTGCTCTCCTCTTACTGCTAT	58	119 bp
<i>CPSF6</i>	AAGATTGCCTTCATGGAATTGAG	TCGTGATCTACTATGGTCCCTCTCT	58	89 bp
<i>IBSP</i>	CAGGGCAGTAGTGACTCATCC	TCGATTCTTCATTGTTTTCTCCT	59	103 bp
<i>IHH</i>	CGACCGCAATAAGTATGGAC	GGTGAGCGGGTGTGAGTG	60	353 bp
<i>PTH1R</i>	GGTGAGGTGGTGGCTGT	AGCATGAAGGACAGGAAC	58	326 bp
<i>PTHLH</i>	CGGTGTTCCCTGCTGAGCTA	TGCGATCAGATGGTGAAGGA	58	161 bp
<i>RPL13</i>	CATTTCTGGCAATTTCTACAG	AGGCAACGCATGAGGAAT	58	524 bp
<i>SOX9</i>	GTACCCGCACTTGCACAAC	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC	60	72 bp

Primer wurden bei Eurofins Genomics (Ebersberg) bestellt.

2.8 Puffer und Lösungen

Alle einfach konzentrierten Gebrauchslösungen wurden durch eine entsprechende Verdünnung der konzentrierten Stammlösungen mit Reinstwasser hergestellt.

2.8.1 Allgemeine Puffer

Phosphate-Buffered Saline (PBS) (10x)

1,37 M NaCl, 26,8 mM KCl, 101,4 mM Na₂HPO₄, 17,6 mM KH₂PO₄.

1x PBS pH 7,4 wurde durch Verdünnen der Stammlösung mit Reinstwasser im Verhältnis 1:10 hergestellt.

Tris-Buffered Saline (TBS) (10x)

250 mM Tris-HCl, 1,45 M NaCl, 27 mM KCl.

Der pH-Wert von 7,6 wurde mit HCl 32% eingestellt. Die einfach konzentrierte Gebrauchslösung wurde durch 1:10-Verdünnung der Stammlösung mit Aqua dest. hergestellt.

Tris-HCl

Alle Tris-HCl Lösungen wurden durch Ansetzen einer Tris Base-Lösung in der benötigten Molarität hergestellt. Der geforderte pH-Wert wurde anschließend mit HCl 32% oder 1 M HCl eingestellt.

2.8.2 Zellkultur-Puffer

Trypsin/EDTA-Lösung

10x Trypsin-EDTA 1:10 in Aqua dest. verdünnen, um eine 0,05%/0,02% Lösung zu erhalten.

0,1% Gelatine

0,1 g Gelatine wurde in 1 l sterilem PBS aufgenommen und durch Aufkochen gelöst.

2.8.3 Puffer für SDS-PAGE und Westernblot

SDS-Sammelgel (5%)

16,4% (v/v) Rotiphorese 30, 150 mM Tris HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,08% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,08% (v/v) TEMED in Aqua dest.

Trenngel (10%)

Materialien

33% (v/v) Rotiphorese 30, 374 mM Tris HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED in Aqua dest.

4x Lämmli-Ladepuffer

249 mM Tris HCl pH 6,8, 33,2% (w/v) Glycerin, 8,0% (w/v) SDS, 0,02% (w/v) Bromphenolblau in Aqua dest. Vor Gebrauch 1:10 mit β -Mercaptoethanol verdünnt eingesetzt.

10x Laufpuffer

248 mM Tris Base, 1,92 M Glycin, 1% (w/v) SDS in Aqua dest.

10x TBE-Puffer für Semi-Dry Blot

10,8% (w/v) Tris, 5,5% (w/v) Borsäure, 2% (v/v) 0,5 M EDTA (pH 8) in Aqua dest. Für die Anwendung 1:10 in Reinwasser verdünnen

TBS-T

0,05% (v/v) Tween[®] 20 in TBS

Blockierungslösung/Milch

5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-T

Coomassie-Färbelösung

0,25% (w/v) Coomassie Brilliantblau, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure in Aqua dest.

Coomassie-Entfärbelösung

25% (v/v) Methanol, 7,5% (v/v) Essigsäure in Aqua dest.

2.8.4 Puffer für Glykosaminoglykan-Quantifizierung

Proteinase-K-Puffer

200 μ g/ml Proteinase K in 0,05 M Tris und 1 mM CaCl₂ in Aqua dest., pH 8

TE-Puffer

20x TE-Puffer (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit) wurde 1:20 in Aqua dest. verdünnt.

DMMB-Färbelösung für Pellets

3,04 g/l Glycin, 2,38 g/l NaCl, 20 mg/l DMMB, pH 3 in Aqua dest., im Dunkeln lagern, ca. 3 Monate haltbar.

DMMB-Färbelösung für Überstände

5,02 mg/ml Glycin, 3,94 mg/ml NaCl, 0,034 mg/ml DMMB, pH 3, im Dunkeln lagern, ca. 3 Monate haltbar.

2.8.5 Puffer für die DNA-Quantifizierung

PicoGreen-Färbelösung

PicoGreen (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit) wurde 1:200 in 1x TE-Puffer verdünnt.

2.8.6 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer

242 g/l Tris Base, 57,1 g/l Eisessig, 50 mM EDTA in Aqua dest., pH 8

6x Ladepuffer

40% Saccharose, 0,25% Bromphenolblau, 30% Glycerin in Reinwasser

1,5% Agarosegel

1,5% Agarose (w/v), 0,03 µl/ml peqGreen in TAE-Puffer

2.9 Zellkulturmedien

Anlösen von Wachstumsfaktoren, Agonisten und Inhibitoren

5 µg TGFβ1 wurden in 100 µl 10 mM Zitronensäure, pH 3, gelöst, und anschließend mit 400 µl PBS auf eine Stammkonzentration von 10 µg/ml verdünnt. 50 µg FGF2 wurden in 500 µl 1% BSA in PBS gelöst und mit Aqua dest. auf eine Stammkonzentration von 10 µg/ml verdünnt. IGF1 und LR3-IGF wurden jeweils in Aqua dest. als Stammlösungen von 200 µg/ml angesetzt. BMP4, BMP6 und BMP7 wurden in PBS mit 4 mM HCl und 0,1% BSA gelöst und auf eine Stammkonzentration von 100 µg/ml gebracht. LDN-212854 wurde als 1 mg/ml Stammlösung in DMSO verwendet. IWP-2 wurde als 50 mM Stammlösung in DMSO angesetzt. 5 mg LY294002 wurden in 581,7 µl DMSO aufgenommen um eine 25 mM Stammlösung zu erhalten. Kollagenase B und Hyaluronidase wurden in PBS aufgenommen.

Enzyme, Wachstumsfaktoren, Agonisten und Inhibitoren wurden nach dem Lösen aliquotiert und bei -20°C oder -80°C gelagert.

Materialien

Expansionsmedium für MSC (ES-Medium)

DMEM Basismedium mit Glukose (4,5 g/l), L-Glutamin (0,58 g/l) und Natriumpyruvat (0,11 g/l) (Life Technologies, Art. 41966), 12,5% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, nicht-essentielle Aminosäuren, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 4 ng/ml FGF2.

FGF2 wurde vor Gebrauch des Mediums frisch hinzugegeben und das Medium anschließend nicht länger als sieben Tage verwendet (Lagerung bei 4°C).

Expansionsmedium für Chondrozyten

DMEM Basismedium mit Glukose (1,5 g/l), L-Glutamin (0,58 g/l) und Natriumpyruvat (0,11 g/l) (Life Technologies, Art. 31885), 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium

40% (v/v) Expansionsmedium, 50% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO

Chondrogenes Differenzierungsmedium

DMEM Basismedium mit Glukose (4,5 g/l), L-Glutamin (0,58 g/l) und Natriumpyruvat (0,11 g/l) (Life Technologies, Carlsbad, USA, Art. 41966), 5 µg/ml Transferrin, 5 ng/ml Natriumselenit, 1,25 mg/ml BSA, 0,1 µM Dexamethason, 0,17 mM Ascorbinsäure-2-phosphat, zusätzlich 1 mM Natriumpyruvat (Endkonzentration 2 mM), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 0,35 mM L-Prolin, 10 ng/ml TGFβ1, 5 µg/ml Insulin. Die Medienzusätze TGFβ1 und Insulin wurden vor Gebrauch frisch zugegeben. Das Medium wurde bei 4°C gelagert und nicht länger als sieben Tage verwendet. Für MSC wurden Insulin, Transferrin, Natriumselenit und BSA durch ITS⁺ Premix (Endkonzentration: 1%) ersetzt.

2.10 Geräte

Bezeichnung

Hersteller

Agarosegel-Belichtungskammer	PEQLAB/VWR (Erlangen)
Agarosegelelektrophorese Kammer	Bio-Rad (Hercules, USA)
DNA/RNA UV Cleaner Hood	Kisker Biotech (Steinfurt)
Edelstahlkugeln 5 mm für Proteinisolierung	Retsch (Haan)
Gießstationen für SDS-Gele	Bio-Rad (Hercules, USA)
Heizplatte für Paraffinschnitte	Medax (Neumünster)
LightCycler 96	Roche Applied Science (Basel, CH)
Mikroskop Axioplan2 Imaging + AxioCam HRC	Zeiss (Oberkochen)
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht (Sondheim vor der Rhön)
Omega FLUOstar Luminometer	BMG LABTECH GmbH (Ortenberg)

pH Meter PB-11, pH Elektrode PY-P11	Sartorius (Göttingen)
Polytron PT MR2100	Kinematika (Luzern, CH)
Schlittenmikrotom Jung Histoslide 2000R	Leica (Wetzlar)
Schwingmühle MM 400	Retsch (Haan)
SDS-PAGE Mini Protean II	Bio-Rad (Hercules, USA)
SDS-PAGE Short und Spacer-Platten 1,5 mm	Bio-Rad (Hercules, USA)
Sunrise Magellan Mikroplattenleser	Tecan (Männedorf, CH)
Wärmeofen für Knorpelverdau Hybrid 2000	H. Saur (Reutlingen)
Western Blot Belichtungskammer Fusion-SL 3500-WL	PEQLAB/VWR (Erlangen)
Western Blot Mini Trans-Blott Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
Zentrifuge Rotina 420	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Universal 320	Hettich (Tuttlingen)
Zellkulturbank HeraSafe	Heraeus Instruments (Hanau)

2.11 Software

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
AxioVision Rel 4.6.3.0	Zeiss (Oberkochen)
Bio-1D	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
BioCapt 44968	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
Endnote™ X9	Clarivate (Philadelphia, USA)
Fusion Molecular Imaging	Vilber Lourmar (Eberhardzell)
LightCycler® 96 Software	Roche Applied Science (Basel, Schweiz)
Magellan 6.6	Tecan (Männedorf, Schweiz)
MS Office	Microsoft (Redmont, USA)
ND-1000 V3.8.1	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Omega Control	BMG LABTECH GmbH (Ortenberg)
Photoshop 7.0.1	Adobe Systems (San José, USA)
SPSS Statistics 25	IBM (Armonk, USA)

3 Methoden

3.1 Rechtliche und ethische Aspekte der Studie

Die Nutzung humaner Gewebeproben im Rahmen dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki von 1975 in ihrer neuesten Fassung genehmigt. Die Verwendung des Probenmaterials bedurfte der schriftlichen Zustimmung der Patientinnen und Patienten, nachdem diese über Wesen und Zweck der Studie sowie eventuelle mit der Probenentnahme verbundene Gesundheitsrisiken aufgeklärt worden waren. Den Teilnehmenden war es zu jeder Zeit möglich, unter Vernichtung des zur Verfügung gestellten Gewebes und der daraus generierten Proben von der Studie zurückzutreten. Vorschriften der ärztlichen Schweigepflicht und des Datenschutzes wurden im Rahmen der Studie eingehalten. Das Studienkonzept wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg begutachtet und bewilligt (Nummer S-117/2014 und S-845/2019).

3.2 Zellkultur

3.2.1 *Gelatine-Beschichtung von Zellkulturplastik*

Um Zellkulturplastik für die Expansion von MSC mit Gelatine zu beschichten, wurde die 0,1% Gelatinelösung zunächst erwärmt. Anschließend wurden 4 bzw. 6 ml Lösung in eine T75 oder T175 Zellkulturflasche überführt und die Gelatine gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilt. Die frisch beschichtete Zellkulturplastik wurde für mindestens 30 Minuten bei RT inkubiert, bevor die Gelatinelösung entfernt und die MSC ausgesät wurden.

3.2.2 *MSC-Isolation aus Knochenmark*

MSC wurden aus humanen Knochenmarksaspiraten von 48 Patientinnen und Patienten isoliert, die sich einer Hüftendoprothese-Operation unterzogen. Das Alter der behandelten Personen lag zwischen 21 und 86 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 63 ± 14 Jahren (22 weiblich, 26 männlich). Das Knochenmarkaspirat wurde zunächst von Knochenstücken sowie Hämagglutinationen befreit und anschließend zweimal mit sterilem PBS und anschließender Zentrifugation (10 Minuten, $650 \times g$) gewaschen. Im Folgenden wurden die im Knochenmarkaspirat vorhandenen Zelltypen über eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation voneinander separiert. Hierfür wurde das gewaschene Knochenmark in 15 – 20 ml PBS aufgenommen, auf 15 ml Ficoll Paque™ geschichtet und für 35 Minuten bei $1460 \times g$ und deaktivierter Bremsfunktion zentrifugiert. Während sich die kernlosen Erythrozyten nach der Zentrifugation am Gefäßboden und die Granulozyten in der darauffolgenden Phase im unteren Teil des Reaktionsgefäßes befanden, sammelten sich die mononukleären Zellen als deutlich sichtbarer

Zellring in der Interphase zwischen Ficoll Paque™ Plus und PBS an. Die mononukleären Zellen wurden mit einer Stabpipette abgenommen und dreimal mit PBS gewaschen und unter absteigender Rotationszahl (650, 450, 290 x g) für jeweils 10 Minuten zentrifugiert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die isolierten Zellen in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:50 in Türckscher Lösung aufgenommen, die die Lyse der noch in Suspension befindlichen Erythrozyten induzierte, und in einer Neubauerzählkammer gezählt. Anschließend wurden 125.000 – 150.000 Zellen pro Quadratcentimeter in eine gelatinisierte Zellkulturflasche mit ES-Medium transferiert, was als Passage 0 (P0) bezeichnet wurde, und in einem Inkubator bei 37°C und 6% CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden wurden nicht-adhärenente hämatopoetische Zellen durch Spülen der Zellkulturflasche mit PBS entfernt. Die adhärenente Zellen bildeten kolonieartige „Spots“ aus und wurden bei etwa 80% Konfluenz durch Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst. Der enzymatische Trypsin-Verdau wurde durch Zugabe von FCS-haltigem DMEM oder Expansionsmedium im Verhältnis 1:2 oder 1:2,5 gestoppt. 10 µl der Zellsuspension wurde in 0,4% Trypanblau-Lösung aufgenommen und die Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellen wurden ab P1 in einer Dichte von 5000 pro Quadratcentimeter ausgelegt und wuchsen in einem homogenen Zellrasen. Das ES-Medium wurde dreimal pro Woche erneuert. Nach Passage 3 wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche verwendet.

3.2.3 AC-Isolation aus Knorpelbiopsien

Knorpelproben wurden aus makroskopisch intakten Bereichen von Tibiaplateau oder Femurkondylen von insgesamt 11 Arthrose-Patientinnen und -Patienten gewonnen, die sich einer Knieendoprothese-Operation unterzogen. Das Alter der behandelten Personen lag zwischen 49 und 77 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 65 ± 9 Jahren (7 weiblich, 5 männlich). Mithilfe eines Skalpell wurde der hyaline Knorpel vom subchondralen Knochen getrennt, möglichst ohne kalzifizierte Knorpelbereiche mit zu überführen, und zerkleinert. Das Knorpelgewebe wurde durch Benetzung mit PBS vor dem Austrocknen geschützt und gewogen. In einem Verdauansatz (10 ml/g Knorpelgewebe), der aus 1,5 mg/ml Kollagenase B und 100 µg/ml Hyaluronidase in Chondrozyten-Expansionsmedium bestand, wurde das zerkleinerte Knorpelgewebe in einem 50-ml-Reaktionsgefäß unter ständiger Rotation bei 37°C für 16 – 20 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die isolierten Chondrozyten mithilfe eines Nygonsieb (40 µm Maschenweite) vom unverdauten Gewebe separiert, durch 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g vom Verdaumedium getrennt und mit 20 ml PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde mithilfe von Trypanblau und einer Neubauerzählkammer bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einer Dichte von 5700 Zellen pro Quadratcentimeter in 25 ml AC-Expansionsmedium aufgenommen, in T175 Zellkulturflaschen ausgelegt und bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden nicht adhärenente Zellen und Geweberückstände durch Spülen der Zellkulturflasche mit PBS entfernt. Bei etwa 80%

Konfluenz wurden die Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst und passagiert. Das AC-Expansionsmedium wurde zweimal pro Woche erneuert. Die isolierten AC wurden nach Passage 2 für die entsprechenden Versuche verwendet.

3.2.4 *Trypsin/EDTA-Behandlung*

Um adhärenente Zellen in Monolayerkultur vom Boden einer Zellkulturflasche abzulösen, wurde zunächst das Medium abgenommen und der Flaschenboden zweimal mit PBS gewaschen, um das Trypsin-inhibierende FCS vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 4 bis maximal 10 Minuten bei 37°C und 6% CO₂ mit 4 ml der Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und die Trypsinreaktion unmittelbar durch Zugabe des jeweiligen FCS-haltigen Expansionsmediums im Verhältnis 1:3 gestoppt. Die Zellsuspension wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS oder dem jeweiligen Kulturmedium aufgenommen. Die Lebendzellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer und 0,4% Trypanblau-Lösung bestimmt, bevor die Zellen entsprechend weiterverwendet wurden.

3.2.5 *Kryo-Konservierung und Auftauen von Zellen*

Die Kryo-Konservierung stellt ein schonendes Einfrierverfahren dar, das die Bildung von Eiskristallen verhindert, was potentielle Zellschädigungen während des Einfrierprozesses minimiert. Sofern sie nicht direkt weiterkultiviert oder geerntet wurden, wurden Chondrozyten nach P0 oder P1 und MSC nach P1 oder P2 eingefroren. Hierfür wurden 1 – 5 Millionen Zellen in 1 ml 4°C kaltes Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Isopropanol-gefüllten Gefrierbehälter über Nacht bei -80°C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden die mit Zellsuspension gefüllten Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die Zellen aufzutauen wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und die aufgetaute Zellsuspension sofort im Verhältnis 1:10 in das jeweilige Zelltyp-spezifische Expansionsmedium in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 300 x g wurden die aufgetauten Zellen vom Einfriermedium getrennt, in 10 ml Expansionsmedium resuspendiert und die Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Lösung und Neubauerzählkammer bestimmt. Anschließend wurden 875.000 MSC oder 1.000.000 AC in jeweils 25 ml ihres entsprechenden Expansionsmedium aufgenommen, so dass MSC in einer Dichte von 5000 Zellen pro Quadratzentimeter und AC in einer Dichte von 5700 Zellen pro Quadratzentimeter in T175 Zellkulturflaschen ausgelegt werden konnten.

3.2.6 *In-vitro-Knorpelneogenese von MSC und AC in 3D-Pelletkultur*

Bei Erreichen von 100% Konfluenz in der finalen Passage wurden MSC oder AC mittels Trypsin/EDTA-Behandlung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, jeweils 500.000 Zellen in 500 µl chondrogenem Medium aufgenommen, das für MSC ITS⁺ Premix oder für AC eine vergleichbare Insulinkonzentration enthielt. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden diese bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Durch Absinken der Zellen und spontane Aggregation bildeten MSC oder AC innerhalb von 24 Stunden Zellpellets am Boden des Reaktionsgefäßes. Nicht aggregierende Zellen oder kleinere Zellpellets an der Gefäßwand, sogenannte „Satellitenpellets“, wurden beim Mediumwechsel an Tag 1 der chondrogenen Kultur entfernt. An Tag 4 oder 5 wurden die Zellpellets mithilfe einer abgeschnittenen 500-µl-Pipettenspitze in eine 96-Loch-Platte mit rundem Boden transferiert und bis Tag 42 der Differenzierung unter chondrogenen Bedingungen kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche.

3.2.7 *Ernte von Pellets und Zellkulturüberständen*

Um Pellets für Westernblot zu ernten, wurden diese vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 1,5-ml-SafeLock-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, nachdem überstehendes Medium rückstandslos entfernt worden war. Um die sensiblen Phosphorylierungsprofile der Zellen nicht zu verfälschen wurden die Pellets nach Entnahme aus der Lochplatte nicht mit PBS gewaschen. Im Gegensatz dazu wurden Pellets, die für Genexpressions- oder histologische Analysen verwendet wurden, nach Überführung in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß vorsichtig mit PBS gespült, um Mediumreste vollständig zu entfernen. Die Pellets wurden anschließend entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Zellkulturüberstände von vier bis fünf Pellets pro Gruppe und Zeitpunkt wurden in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß vereinigt, vorsichtig homogenisiert und die Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für das Einfrieren von Pellets oder Zellkulturüberständen in flüssigem Stickstoff wurden stets SafeLock-Reaktionsgefäße verwendet.

3.3 Histologische Analysen

3.3.1 *Fixierung und Paraffineinbettung von MSC- und AC-Pellets für histologische Untersuchungen*

Pellets wurden für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 200 µl 4% PFA behandelt, zweimal in PBS gewaschen und einer aufsteigenden Isopropanolreihe von 70, 96 und 100% unterzogen. Anschließend wurden die Pellets mit wenigen Tropfen einer 0,01% Eosinlösung gefärbt, mit 100% Isopropanol gewaschen und für jeweils 2 Stunden in Aceton bei RT bzw.

flüssigem Paraffin bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Pellets in Blockgefäße mit frischem flüssigem Paraffin überführt und mittig platziert. Das Paraffin härtete über Nacht bei RT aus.

3.3.2 Anfertigen von Mikrotomschnitten

Die Paraffinblöckchen wurden zunächst auf ca. 4°C gekühlt, bevor an einem Schlittenmikrotom 5 µm dünne Schnitte angefertigt wurden. Sobald die Pelletmitte erreicht war, wurden acht bis zehn Schnitte angefertigt und zunächst im Wasserbad bei 38°C gestreckt. Anschließend wurden in chronologischer Reihenfolge jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen, für ein bis zwei Stunden auf einer 36°C warmen Heizplatte getrocknet und nach mindestens einer Stunde für 24 Stunden bei 42°C in einem Wärmeschrank getrocknet.

3.3.3 Entparaffinierung, Rehydrierung und Dehydrierung von Schnitten

Vor einer histologischen Färbung wurden die Schnitte im organischen Lösungsmittel Roti[®]-Histol viermal für 5 Minuten entparaffiniert und in einer absteigenden Isopropanol-Reihe (100%, 90%, 70%, 50%) und Aqua dest. für jeweils 5 Minuten rehydriert. Nach einer immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte mit Aquatex und einem Deckglas eingedeckt. Nach einer Färbung in wässrigen Lösungen wurden die Schnitte kurz in Isopropanol (96% und zweimal 100%) für 10 - 30 Sekunden teilentwässert und für viermal 5 Minuten in Roti[®]-Histol inkubiert, bevor sie mit Neo-Mount und einem Deckglas eingedeckt wurden.

3.3.4 Safranin-O-Färbung

Zur Färbung von in die Pelletmatrix abgelagerten Proteoglykanen wurde Safranin O verwendet, ein kationischer Farbstoff, der die negativ geladenen Proteoglykane im Knorpel orange-rot färbt. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte wurden diese zweimal für 5 Minuten in Aqua dest. inkubiert und anschließend für 20 Minuten in 0,2% Safranin-O-Lösung gefärbt. Überschüssige Lösung wurde im Anschluss durch dreimaliges Spülen mit Aqua dest. entfernt. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 20 Sekunden mit 0,04% Fast Green-Lösung behandelt, um Safranin-O-ungefärbtes und somit Proteoglykan-armes Gewebe grün darzustellen. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. wurden die Proben wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben dehydriert und eingedeckt.

3.3.5 Immunhistochemische Detektion von Kollagen Typ II

Um Kollagen Typ II immunhistochemisch nachzuweisen, wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte für 2 Minuten in PBS äquilibriert. Um die entsprechenden Antigene für die Färbung freizulegen, folgte ein 15-minütiger Verdau der Schnitte in einer feuchten Kammer mit 4 ng/ml Hyaluronidase in PBS pH 5,5 bei 37°C. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für

2 Minuten mit PBS gewaschen und für weitere 30 Minuten mit 1 mg/ml Pronase in PBS bei 37°C verdaut, woraufhin unspezifische Bindestellen bei RT für 30 Minuten mit 5% BSA in PBS abgesättigt wurden. Die Inkubation mit Primärantikörper gegen Kollagen Typ II (1:1000 in 1% BSA/PBS) erfolgte über Nacht bei 4°C. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt mit 1% BSA in PBS ohne Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS für jeweils 5 Minuten entfernt und die Schnitte mit ALP-gekoppeltem Sekundärantikörper (Bright Vision) für 30 Minuten bei RT inkubiert, bevor erneute Waschschritte mit TBS erfolgten. Anschließend wurden die Schnitte für 10 bis 15 Minuten mit ImmPact Vector Red-Substratlösung im Dunklen bei RT inkubiert. In den Bereichen der Schnitte, in denen Sekundärantikörper gebunden war, entstand durch den Substratumsatz der ALP ein roter Farbniederschlag. Nachdem der Färbevorgang durch einen weiteren TBS-Waschschritt beendet worden war, wurden die Zellkerne für 3 Minuten in Hämalaun nach Mayer gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend zweimal in Leitungswasser gespült und abschließend für 15 Minuten in Leitungswasser gebläut. Abschließend wurden die Schnitte wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben eingedeckt.

3.4 Biochemische Analysen

3.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Um die Phosphatgruppen phosphorylierter Proteine während der Proteinisolation zu schützen, wurde der Lysepuffer PhoshoSafe verwendet, der zusätzlich mit dem Serin-Protease-Inhibitor Pefabloc versetzt wurde (Endkonzentration: 1mM). Pellets wurden in je 60 µl des PhoshoSafe/Pefabloc-Puffers aufgenommen und in ein gekühltes 1,5-ml-SafeLock-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe einer eisgekühlten Metallkugel wurden die Pellets in einer Schwingmühle für 2x 2 Minuten bei 30 Hz mechanisch aufgeschlossen. Die Proben wurden zwischen einzelnen Schritten auf Eis gekühlt. Die Zellysate wurden anschließend bei 13.000 x g für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die klaren Überstände in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und die enthaltenen Proteine durch 5-minütiges Aufkochen bei 95°C und 550 rpm im Heizblock denaturiert. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.4.2 SDS-PAGE

Um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufzutrennen, wurde *die sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) verwendet. Das dafür hergestellte Polyacrylamid-Gel enthielt das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS), das die Eigenladung der Proteine durch negative Ladungen überlagert. Die gegenseitige Abstoßung dieser negativen Ladungen trägt zur Linearisierung der zuvor gefalteten Proteine bei. Da sich die

Proteine im elektrischen Feld mit zunehmender Molekülgröße langsamer durch das Polyacrylamid-Gel in Richtung des positiven Pols bewegen, werden die in der Probe enthaltenen Proteine der Größe nach aufgetrennt. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 1,5 mm dicke Gele mit 10 oder 15 Taschen hergestellt, die aus einem unteren 10% Trenngel und einem oberen 5% Sammelgel bestanden. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Gele in feuchte Papiertücher und einer Plastikfolie eingewickelt und über Nacht bei 4°C gelagert.

Für die SDS-PAGE wurden die Gele in die Laufkammer eingespannt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Jeweils 20 µl des mit 4x Laemmli-Puffer versetzten Zelllysats, was einem Viertel eines Pellets entsprach, wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Als Referenz für die Proteingröße wurden 5 µl des Markers Precision Plus Protein Standards™ Dual Color von Bio-Rad verwendet. Nach 30-minütiger Konzentration der Proteine im Sammelgel bei 80 V wurde die Spannung für eine Stunde auf 120 V erhöht und der Lauf gestoppt, wenn die blaue Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Anschließend wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für 5 Minuten in 1x TBE-Puffer vorsichtig geschwenkt, um das SDS aus dem Gel zu lösen und so die Blotting-Effizienz zu erhöhen.

3.4.3 Westernblot

Der Proteintransfer vom SDS-Gel auf eine Amersham Hybond ECL Nitrozellulosemembran erfolgte mittels der Semi-Dry-Blot-Methode. Dafür wurden Membran und Whatman-Papiere zunächst in 1x TBE-Puffer getränkt und anschließend in bestimmter Reihenfolge übereinandergeschichtet. Auf einen Stapel aus drei Whatman-Papieren folgte die Membran, auf der das Gel mittig und ohne Luftblasen einzuschließen platziert wurde. Der Stapel schloss mit drei weiteren Whatman-Papieren ab. Der Transfer erfolgte für 12 Minuten bei 1,3 A (bis 25 V) in der Turboblot-Apparatur von Bio-Rad. Im Anschluss wurde das Gel kurz in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärberlösung entfärbt, um nicht transferierte Proteine nachzuweisen. Die Membran wurde für 10 Minuten in Ponceau-S-Färbelösung gefärbt und in Aqua dest. entfärbt, was die übertragenen Proteinbanden sichtbar machte. Anschließend wurde die Membran in einer Plastikfolie bei 50 kDa geschnitten, die Membranabschnitte in TBS-T entfärbt und für 1 Stunde bei RT in 5% Milch/TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Im folgenden Schritt wurden die Membranabschnitte in 15-ml-Reaktionsgefäße mit dem jeweiligen Primärantikörper in 5% Milch/TBS-T überführt und je nach Antikörper bei RT oder 4°C inkubiert. Nach 3x 5-minütigem Waschen mit TBS-T folgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei RT, der mit Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt war. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Komponenten der Detektionslösung, die das HRP-Substrat enthielten, 1:1 gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Für die Detektion starker Signale wie β -Aktin wurde das Lumi-Light Western Blotting Substrat von Roche Applied Science verwendet, während schwächere Signale mit dem WesternBright

Chemilumineszenz Substrat Quantum von Advansta detektiert wurden. Die Proteinsignale wurden in einer Belichtungskammer entwickelt und die detektierten Protein- und Markerbanden wurden mit Hilfe von Photoshop zusammengestellt.

3.4.4 Densitometrische Analyse

Für jede Proteinbande wurde die optische Dichte der detektierten Pixel mit Hilfe des BIO-1D-Programms semiquantifiziert. Hierfür wurden aufgrund der 256-fach höheren Grauauflösung 16-bit-Formate statt 8-bit-Bilder verwendet. In einem ersten Schritt der Quantifizierung wurde zunächst das Hintergrundsignal mit der Hügel-zu-Hügel-Methode manuell bestimmt und vom Gesamtbild subtrahiert. Anschließend wurde die zu messende Bandenbreite bestimmt und das „Volumen“ der Signale berechnet. Die ermittelte Signalintensität des jeweiligen Proteins wurde zur Normalisierung auf die Bandendichte von β -Aktin bezogen.

3.4.5 Quantifizierung des Glykosaminoglykangehalts in Pellets und Zellkulturüberständen

Die Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts in Knorpel pellets oder Zellkulturüberständen erfolgte durch den 1,9-Dimethylmethylenblau (DMMB)-Assay (Farndale et al. 1986). Der Assay basiert auf der metachromatischen Färbung der GAGs durch den Farbstoff DMMB. Um die GAGs aus der Knorpelmatrix herauszulösen, erfolgte zunächst ein enzymatischer Verdau durch Proteinase K. Hierfür wurden zwei Zellpellets pro Gruppe und Zeitpunkt in 200 μ l 0,1 mg/ml Proteinase K-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 60°C und 800 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und bis zur GAG-Messung bei -20°C gelagert. Für die Messung wurden die Proben auf Eis aufgetaut, je nach Kulturdauer der Pellets in 1x TE-Puffer verdünnt (Pellets von Tag 0 - 14: unverdünnt oder 1:2, Pellets von Tag 21 - 42: 1:3 bis 1:5) und jeweils 30 μ l der verdünnten Verdauung in eine 96-Loch-Flachbodenplatte vorgelegt. Eine Standardkonzentrationsreihe von 7,8 μ g/ml bis 500 μ g/ml wurde aus einer 10 mg/ml Chondroitin-6-Sulfat-Stammlösung schrittweise durch 1:2-Verdünnungen in 1x TE-Puffer hergestellt und ebenfalls je 30 μ l vorgelegt. Als Blank diente 1x TE-Puffer. Zu den Proben, dem

Standard und dem Blank wurden je 200 μ l DMMB-Färbelösung für Pellets zugegeben und die Absorption bei 530 nm im OMEGA-Plattenlesegerät gemessen. Die ermittelten Werte wurden auf den DNA-Gehalt der Proben normalisiert. Zur Bestimmung des GAG-Gehalts in Zellkulturüberständen wurden diese nach der Lagerung bei -20°C auf Eis aufgetaut, homogenisiert und kurz abzentrifugiert. 30 μ l der Proben wurden unverdünnt in eine 96-Loch-Flachbodenplatte vorgelegt. Frisches chondrogenes Medium diente als Blank. Nach Zugabe von jeweils 200 μ l DMMB-Lösung für Zellkulturüberstände wurde die Messung wie oben beschrieben durchgeführt. Alle Messungen wurden als Duplikate durchgeführt.

3.4.6 Quantifizierung des DNA-Gehalts in Pellets

Der DNA-Gehalt pro Pellet wurde anhand des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assays bestimmt, der auf der Messung eines grünen Fluoreszenzsignals nach Bindung des Farbstoffs Fluorescein an die DNA beruht. Zunächst wurden die mit Proteinase K verdauten Proben im Verhältnis 1:10 in 1x TE-Puffer verdünnt. Aus einer 100 µg/ml λ-DNA-Stammlösung wurde in 1:2-Verdünnungsschritten in 1x TE-Puffer eine Standardkonzentrationsreihe erstellt (1 µg/ml bis 15,625 ng/ml). Anschließend wurden 80 µl 1x TE-Puffer in eine schwarze 96-Well-Flachbodenplatte vorgelegt und jeweils 20 µl Probe oder Standard zugegeben. Als Blank diente das gleiche Gesamtvolumen 1x TE-Puffer. Die PicoGreen-Färbelösung wurde 1:200 in 1x TE-Puffer verdünnt und je 100 µl zu Blank, Standard und Proben hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Fluoreszenz anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm im OMEGA-Plattenlesegerät gemessen.

3.4.7 Bestimmung der ALP-Aktivität in Zellkulturüberständen

Die Bestimmung der ALP-Aktivität in Zellkulturüberständen beruht auf der ALP-vermittelten Hydrolyse des Substrats para-Nitrophenylphosphat, wodurch es zur Bildung von gelbem p-Nitrophenol kommt. Um den Verlauf der ALP-Aktivität während der 3D-Kultur von MSC und AC oder unter verschiedenen Behandlungen zu bestimmen, wurden stets die Zellkulturüberstände derselben vier bis fünf Pellets pro Gruppe verwendet. In wöchentlichem Abstand wurden unmittelbar vor dem Mediumwechsel und somit 48 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel jeweils 150 µl Überstand der entsprechenden Pellets in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß gesammelt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur Messung bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der ALP-Aktivität wurden die Proben aufgetaut, homogenisiert und kurz abzentrifugiert. Eine p-Nitrophenol-Standardreihe (100 µg/ml bis 1 µg/ml) wurde in 1:2-Verdünnungen in frischem chondrogenen Medium angesetzt. Als Blank wurde chondrogenes Medium ohne p-Nitrophenol verwendet. Jeweils 100 µl der Proben, der Standardreihe und des Blanks wurden als Duplikate in eine 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert und mit jeweils 100 µl der Substratlösung versehen, die sich aus 10 mg/ml p-Nitrophenolphosphat in ALP-Puffer zusammensetzte. Die Proben wurden für 3 Stunden bei RT inkubiert und die Absorptionsänderungen bei 405/490 nm alle 30 Minuten gemessen. Anhand der p-Nitrophenol-Standardkurve wurde die Menge des durch die ALP umgesetzten Substrats bestimmt und die ALP-Aktivität in ng/ml/min angegeben.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA der Zellen wurde mit Hilfe von Phenol und Chloroform extrahiert. Die einphasige Guanidinisothiocyanat/Phenol-Lösung (peqGold Trifast) lysiert die Zellen, denaturiert Proteine und stabilisiert die RNA. Nach der Zugabe von Chloroform sammeln sich DNA und Proteine in der organischen Phenol/Chloroform-Phase oder der Phasengrenze, während die RNA sich in der wässrigen Phase im Überstand befindet. Pro Gruppe wurden vier bis fünf Pellets in einem Polytronröhrchen in 1 ml Trifast aufgenommen und mit Hilfe des Polytrons für vier Durchgänge à 20 Sekunden mechanisch zerkleinert. Um eine Erwärmung der Proben zu vermeiden, wurden diese nach jedem Durchgang auf Eis gekühlt. Wenn eine Probe vollständig zerkleinert war, wurde das Polytronmesser nacheinander mit jeweils 1 ml 0,5 M NaOH, RNase-freiem Wasser und Trifast gespült. Anschließend wurden die Lysate in RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C eingefroren.

Zur Isolation der RNA wurden die Trifast-Lysate bei RT aufgetaut, für 30 Sekunden gevortext und anschließend für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben 30 Sekunden lang gevortext und erneut für 10 Minuten bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben bei 13.000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde daraufhin in ein neues RNase-freies 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte, indem 500 µl Isopropanol zugegeben wurde, die Probe für 30 Sekunden gevortext und für 15 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 x g und 4°C für 15 Minuten wurde das Präzipitat zweimal mit 1 ml eiskaltem 75% Ethanol gewaschen und nach jedem Waschschrift wieder für 15 Minuten bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Ethanol vollständig abgenommen und die Reste durch Verdampfen bei geöffnetem Deckel entfernt, wobei das zunächst weißlich erscheinende RNA-Pellet transparent wurde. Die Gesamt-RNA wurde schließlich in 10 mM Tris HCl resuspendiert und die RNA-Konzentration am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer ermittelt. Hierfür wurde die UV-Lichtabsorption von 1 µl der jeweiligen Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Reinheit der Probe wurde anhand des Verhältnisses UV260/UV280 bestimmt, da Proteine und Phenole ein Absorptionsmaximum von 280 nm aufweisen. Ein 260/280-Verhältnis von 1,8 bis 2,0 deutete auf eine ausreichend reine nukleinsäurehaltige Probe hin.

3.5.2 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)

Zur Herstellung eines DNA-Templates für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde mRNA in stabilere complementary DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgte mithilfe der Reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt und mit RNase freiem Aqua dest. auf 9 µl

Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/ml) wurden die Proben für 10 Minuten bei 70°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Anschließend wurde ein Mastermix hinzugefügt, der aus 2 µl RT-Puffer, 1 µl RNaseOUT+, 1 µl dNTPs (5 mM) und 5 µl RNase-freiem Aqua dest. pro Probe bestand. Dieser Ansatz wurde für 2 Minuten bei 42°C erhitzt und anschließend jeweils 1 µl Omniscript RT hinzugefügt. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die RT-Enzymaktivität durch Erhitzen auf 93°C für 5 Minuten abgestoppt. 10 µl der synthetisierten cDNA wurde 1:5 mit RNase freiem Aqua dest. verdünnt und zusammen mit den nicht verdünnten Proben bei -20°C gelagert.

3.5.3 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) basiert auf einer DNA-Replikation mit simultaner Messung der relativen Zunahme an DNA-Molekülen nach jedem Amplifikationsschritt. Nach Aufbrechen des DNA-Doppelstrangs in der Denaturierungsphase, lagern sich sequenzspezifische Primer abhängig von der Primer-spezifischen Annealingtemperatur an die DNA an. In der darauffolgenden Elongationsphase vervollständigt die DNA-Polymerase durch das Anfügen von dNTPs den neuen DNA-Strang. Dieser Zyklus wurde 45-mal wiederholt. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe des interkalierenden Farbstoffs SYBR® Green, der sich während der Amplifikation an doppelsträngige DNA anlagert. Nach jedem Zyklus wird der Fluoreszenzfarbstoff mit einer Wellenlänge von 494 nm angeregt und die Intensität des Emissionslichts bei 521 nm vom Gerät detektiert. Wenn erstmalig signifikant Hintergrundsignale überschritten werden, wird dieser Wert als *cycle threshold* (Ct-Wert) bezeichnet. Er korreliert mit der relativen Ausgangsmenge eines cDNA-Abschnitts in der Probe. Die Spezifität des Amplifikats wurde nachgewiesen, indem die generierte dsDNA durch kontinuierlichen Temperaturanstieg getrennt wird, was zum Abfall des emittierten Lichts führt. Abhängig vom Guanin-/Cytosin-Gehalt des Produkts und dem abnehmenden Fluoreszenzsignal ergibt sich für jedes Produkt eine spezifische sogenannte Schmelzkurve. In der vorliegenden Arbeit wurde das Lightcycler-System von Roche verwendet mit dem unten angegebenen Reaktionsansatz und unter den angegebenen Reaktionsbedingungen.

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>Reaktionszyklus und Temperaturverlauf:</u>		
12,5 µl	SYBR® Green Mix	Anzahl	Zeit [Sek.]	Temp.
0,5 µl	Forward-Primer	Präinkubation	1x	600 95°C
0,5 µl	Reverse-Primer	Denaturierung		15 95°C
2,0 µl	cDNA (1:5 verdünnt)	Anlagerung	45x	20 58-61°C
9,5 µl	RNAse freies Wasser	Elongation		30 72°C
				30 95°C
		Melting	1x	30 55°C
				200 0,2°C/Sek.
				1 95°C

3.5.4 Auswertung der Real-Time PCR

Die Expression eines Gens wird in der Regel auf ein möglichst konstant exprimiertes Referenzgen normalisiert, um Unterschiede in der Qualität und Quantität der einzelnen cDNA-Präparationen auszugleichen und die relative Genexpression zu berechnen. Als Referenzgene dienten in dieser Arbeit *RPL13*, das für das ribosomale Protein L13 kodiert und zur Proteintranslation beiträgt, und *CPSF6*, das für die Untereinheit 6 des *Cleavage and polyadenylation specificity factor* kodiert und in die mRNA-Prozessierung involviert ist. Für jede Probe wurde der Mittelwert der beiden Referenzgene vom Ct-Wert des untersuchten Gens subtrahiert. Mit dem erhaltenen ΔCt -Wert und unter Berücksichtigung einer vom Hersteller angegebenen theoretischen 1,8-fachen Amplifikation eines Templates pro Zyklus wurde die relative Genexpression berechnet:

$$relative\ Genexpression\ (\%) = 1,8^{(-\Delta Ct)} \times 100$$

3.5.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Spezifität des vervielfältigten PCR-Produkts wurde mittels Gelelektrophorese in einem 1,5%-igen Agarosegel kontrolliert. Je höher der Prozentsatz an Agarose, umso stärker sind die Quervernetzungen im Gel, die beim Auspolymerisieren entstehen. Für die Herstellung eines 1,5%-igen Gels wurden 2,25 g Agarose in 150 ml 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und unter Rühren auf etwa 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 4,5 µl des interkalierenden DNA-Farbstoffs *peqGreen* wurde die Agaroselösung in eine Gelkammer mit Kämmen gegossen, woraufhin das Gel für etwa 20 Minuten auspolymerisierte. Die PCR-Proben wurden mit 2 µl des 6x Ladepuffers versetzt und in die Taschen des Agarosegels geladen, wobei eine Tasche pro Reihe mit 5 µl einer 100-bp-DNA-Leiter als Längenstandard befüllt wurde. Bei 120 V für 35 Minuten bewegten sich die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung Anode und

wurden ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Bandenhöhe der spezifischen PCR-Produkte im Gel wurden anschließend unter UV-Belichtung sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software SPSS 25.0 von IBM durchgeführt. Die Anzahl der verwendeten unabhängigen MSC- oder AC-Spenderpopulationen für jeden Versuch wurde in den Beschriftungen der entsprechenden Abbildungen angegeben. Für die Berechnung relativer Veränderung wurde die Kontrolle wie unter den jeweiligen Abbildungen angegeben auf 1 gesetzt. Unterschiede zwischen Gruppen wurden entweder mit dem studentischen t -Test oder mit dem Rangsummen-basierten Mann-Whitney-U (MWU) berechnet. Ein Wahrscheinlichkeitswert von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Hinweise auf unterschiedliche AKT-Aktivierung in MSC und AC durch Analyse von Microarray-Daten

Um Hinweise zu erhalten, ob eine unterschiedliche AKT-Aktivierung während enchondraler MSC-Differenzierung und AC-Redifferenzierung zu erwarten sein könnte, sollte zunächst die Expression von AKT-Signalwegkomponenten zwischen MSC-Chondrogenese und AC-Redifferenzierung verglichen werden. Hierfür wurden bestehende Daten einer globalen Transkriptomanalyse (durchgeführt am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung Genomic and Proteomics, angewiesen von Verena Dexheimer, 2011) auf unterschiedliche Expressionslevel von wichtigen Komponenten des AKT-Signalweges an Tag 0 und Tag 28 der Knorpelneogenese von MSC und AC hin überprüft. Für diese Analyse wurden die wichtigsten Komponenten des PI3K/AKT-Signalweges ausgewählt, die bekanntermaßen die Transkription von *AKT1*, *AKT2* und *AKT3* regulieren oder an der AKT-Phosphorylierung beteiligt sind.

An Tag 0 waren mit *JUN*, *JUNB*, *JUND*, *STAT3* vier von fünf relevanten Transkriptionsfaktoren, die die *AKT*-Expression stimulieren, in MSC niedriger exprimiert als in AC, was im Einklang mit einer 2-fach niedrigeren *AKT1*-Expression in MSC stand (Tabelle 2). *AKT2* bzw. *AKT3*, die vor allem mit Glukosemetabolismus bzw. neuronaler Entwicklung assoziiert werden, waren in beiden Zelltypen weder an Tag 0 noch an Tag 28 in nennenswertem Ausmaß exprimiert. Die AKT-Aktivatoren *IGFBP3* bzw. *IGFBP5* waren in MSC im Vergleich zu AC 2,7-fach bzw. 4-fach niedriger exprimiert. Zusätzlich waren von insgesamt sieben mindestens 1,5-fach unterschiedlich exprimierten AKT-Inhibitoren fünf in MSC höher als in AC (*PPP2RA*, *PPP2R3C*, *PPP2R5C*, *IGFBP6* und *IGFBP7*), was insgesamt auf eine geringere AKT-Aktivierung in MSC als in AC an Tag 0 hindeutete. An Tag 28 waren zwar einerseits neben 2,2-fach erhöhten *JUNB*-Spiegeln, die im Einklang mit 1,5-fach erhöhtem *AKT1* standen, auch der AKT-Agonist *IGFBP5* um das 5,6-Fache erhöht und die mRNA-Spiegel des AKT-Inhibitors *IGFBP6* 11,7-fach reduziert (Tabelle 2). Da aber andererseits auch wichtige AKT-Signalwegkomponenten wie *PIK3R*, eine von insgesamt fünf regulatorischen PI3K-Untereinheiten, oder das Adapterprotein *IRS2* in MSC niedriger exprimiert waren als in AC, ließen die Daten nicht einheitlich auf eine Regulationsrichtung schlussfolgern. Zusammenfassend deutete die Analyse der Genexpression relevanter AKT-Signalwegkomponenten auf eine unterschiedliche AKT-Aktivierung in MSC und AC an Tag 0 der 3D-Knorpelneogenese hin.

Ergebnisse

Tabelle 2: Gemittelte Microarrayexpressionswerte von AKT-Signalwegkomponenten an Tag 0 und Tag 28 der chondrogenen 3D-Pelletkultur in MSC versus AC; n = 4 -5.

Liganden	Tag 0			Tag 28		
	MSC	AC	x-fach	MSC	AC	x-fach
<i>INS</i> Insulin	/	/	/	82	/	1,3
<i>IGF-1</i> Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1	86	/	/	/	/	1,0
Rezeptoren und Adapterproteine						
<i>INSR</i> Insulinrezeptor	/	/	/	/	/	1,0
<i>IGF1R</i> IGF1-Rezeptor	87	95	-1,1	/	/	1,1
<i>IRS1</i> Insulinrezeptorsubstrat 1	823	273	3,0	266	253	1,1
<i>IRS2</i> Insulinrezeptorsubstrat 2	173	315	-1,8	174	315	-1,8
<i>GRB2</i> <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>	241	126	1,9	117	133	-1,1
AKT-regulierende Transkriptionsfaktoren						
<i>JUN</i> Jun Proto-Onkogen, AP1-Untereinheit	1940	3834	-2,0	1672	2362	-1,4
<i>JUNB</i> JunB Proto-Onkogen, AP1-Untereinheit	968	3146	-3,2	1558	703	2,2
<i>JUND</i> JunD Proto-Onkogen, AP1-Untereinheit	9560	15986	-1,7	8075	6188	1,3
<i>STAT3</i> <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>	714	1760	-2,5	1568	1646	-1,0
<i>AATF</i> <i>Apoptosis antagonizing transcription factor</i>	375	436	-1,2	376	372	1,0
AKT-Isoformen						
<i>AKT1</i> V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	1904	3807	-2,0	2404	1600	1,5
<i>AKT2</i> V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	83	/	/	/	/	-1,1
<i>AKT3</i> V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3	/	/	/	/	/	-1,1
PI3K-Untereinheiten						
<i>PIK3CA</i> PI3K: katalytische Untereinheit p110a	/	/	/	81	/	1,0
<i>PIK3CB</i> PI3K: katalytische Untereinheit p110b	83	/	/	/	/	-1,1
<i>PIK3CD</i> PI3K: katalytische Untereinheit p110-δ	85	100	-1,2	/	/	1,0
<i>PIK3CG</i> PI3K: katalytische Untereinheit p110-γ	/	/	/	/	/	1,1
<i>PIK3R1</i> PI3K: regulatorische Untereinheit p85a	229	247	-1,1	413	1219	-2,9
<i>PIK3R2</i> PI3K: regulatorische Untereinheit p85β	1759	2310	-1,3	1933	1495	1,3
<i>PIK3R3</i> PI3K: regulatorische Untereinheit p55-γ	/	/	/	/	/	-1,1
<i>PIK3R4</i> PI3K: regulatorische Untereinheit p150	131	130	1,0	117	112	1,1
<i>PIK3R5</i> PI3K: regulatorische Untereinheit p101	/	/	/	/	/	1,0
AKT-Induktoren und -Signalverstärker						
<i>PDPK1</i> <i>Phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>	669	819	-1,2	790	694	1,1
<i>MAPKAP1</i> <i>MAPK associated protein 1, mTORC2-Untereinheit</i>	379	190	2,0	258	194	1,3
<i>IGFBP3</i> IGF-Bindeprotein 3	3464	9473	-2,7	1515	2108	-1,4
<i>IGFBP5</i> IGF-Bindeprotein 5	2598	10391	-4,0	10003	1774	5,6
Inhibitoren						
<i>PTEN</i> <i>Phosphatase and tensin homolog</i>	529	422	1,3	728	744	-1,0
<i>SHIP2</i> <i>SH2-domain-containing inositol 5'-phosphatase</i>	710	1286	-1,8	1432	587	2,4
<i>PHLPP1</i> <i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatases 1</i>	/	84	/	/	/	-1,1
<i>PPP2R2A</i> Proteinphosphatase 2, regul. Untereinheit B alpha	925	611	1,5	215	144	1,5
<i>PPP2R3C</i> Proteinphosphatase 2, regul. Untereinheit B''gamma	333	200	1,7	/	119	-1,6
<i>PPP2R5B</i> Proteinphosphatase 2, regul. Untereinheit beta	146	210	-1,4	226	146	1,5
<i>PPP2R5C</i> Proteinphosphatase 2, regul. Untereinheit gamma	1208	739	1,6	1296	881	1,5
<i>IGFBP1</i> IGF-Bindeprotein 1	177	231	-1,3	/	/	-1,1
<i>IGFBP2</i> IGF-Bindeprotein 2	1218	6551	-5,4	470	318	1,5
<i>IGFBP4</i> IGF-Bindeprotein 4	23931	25293	-1,1	8105	5402	1,5
<i>IGFBP6</i> IGF-Bindeprotein 6	7022	1863	3,8	459	5375	-11,7
<i>IGFBP7</i> IGF-Bindeprotein 7	5401	2899	1,9	3643	5142	-1,4

gelb: mindestens 1,5-fach höher exprimiert in MSC als in AC
blau: mindestens 1,5-fach niedriger exprimiert in MSC als in AC

4.2 Antikörper-Etablierung zum Nachweis der AKT-Phosphorylierung auf Proteinebene

Um die AKT-Aktivierung durch Phosphorylierung nachweisen zu können, musste zunächst ein geeigneter Antikörper etabliert werden. Es wurde der polyklonale *phospho-AKT (Ser473) Antikörper* (Cat. #9271) von Cell Signaling Technology, der die AKT-Phosphorylierung an Serin 473 nachweist, sowie der AKT-Antikörper (Cat. #9272) derselben Firma für die Detektion des Gesamt-AKT-Proteins ausgetestet. Für die Evaluierung der Antikörper wurde auf bereitgestellte Proteinlysate zurückgegriffen, für deren Generierung C2C12-Zellen durch H₂O₂-Behandlung (5 mM) für 15 Minuten oxidativem Stress ausgesetzt wurden, was den wichtigsten AKT-Induktor, die PI3-Kinase, aktiviert (Proteinlysate generiert von Elisabeth Krämer). Proteinlysate der Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden als Duplikate auf ein SDS-PAGE-Gel geladen und nach Proteinauftrennung auf dieselbe Membran geblottet. Während eine Membranhälfte mit dem in unserem Labor bereits etablierten pPI3K-Antikörper inkubiert wurde, wurde die andere Membranhälfte mit pAKT- und anschließend AKT-Antikörper behandelt. Detektion der pPI3K ergab wie erwartet zwei starke Banden auf einer Höhe von etwa 60 kDa und 150 kDa und eine dritte schwächere Bande, die knapp unter 70 kDa lag, was die Phosphorylierung der PI3K-Untereinheiten bestätigte (Abbildung 5A). Die Detektion von pAKT- und AKT-Protein ergab deutliche Banden auf der erwarteten Höhe von 60 kDa (Abbildung 5A rechts, B). Während ein starkes pAKT-Signal spezifisch in der H₂O₂-stimulierten Gruppe detektiert wurde, waren die Gesamt-AKT-Proteinspiegel wie erwartet sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe nachweisbar, wobei auch hier höhere AKT-Proteinspiegel in der H₂O₂-stimulierten Gruppe auftraten (Abbildung 5A, B). Für beide Antikörper waren auf der gesamten

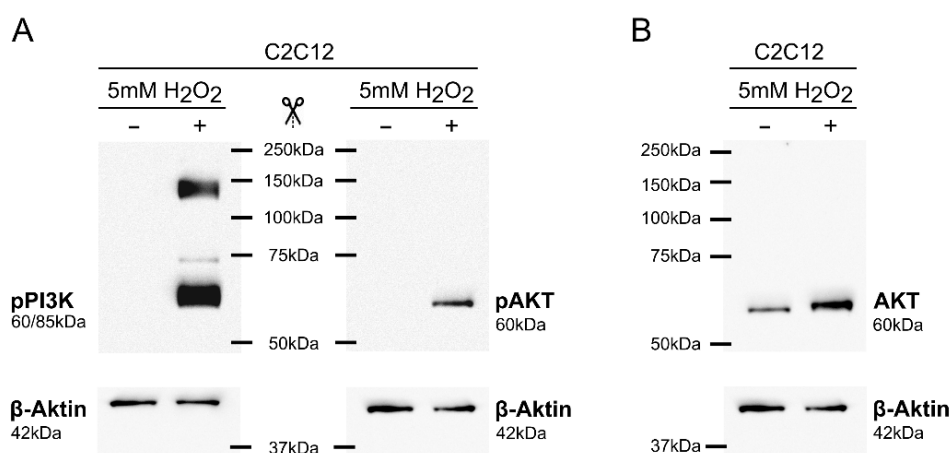


Abbildung 5: Etablierung von pAKT- und AKT-Antikörper mittels Westernblot in mit H₂O₂ stimulierten C2C12-Zellen. Um die PI3K und somit AKT zu aktivieren, wurden C2C12-Zellen für 15 Minuten mit 5 mM H₂O₂ behandelt. Die Proteinlysate der nicht behandelten Kontrolle (-) und der H₂O₂-Gruppe (+) wurden jeweils als Duplikate auf dasselbe SDS-PAGE-Gel geladen. Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran vertikal durch die zentral platzierte Markerbande geschnitten und jeweils eine Membranhälfte mit Antikörper gegen pPI3K (60/85 kDa) bzw. pAKT (A) und AKT (B, beide 60 kDa) und entsprechenden Sekundärintikörpern inkubiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Membran keine unspezifischen Banden zu erkennen. Somit wurden beide Antikörper als geeignet angesehen, die pAKT- und AKT-Proteinspiegel im weiteren Projektverlauf zuverlässig nachzuweisen.

4.3 AKT-Aktivierung zu Beginn der 3D-Knorpelneogenese von MSC und AC

4.3.1 Vergleich der pAKT-Proteinspiegel zu Beginn der 3D-Knorpelneogenese von MSC und AC

Die aus den Genexpressionsdaten abgeleitete Hypothese, dass MSC mit niedrigerer AKT-Aktivierung als AC in die 3D-Knorpelneogenese starteten, wurde im Folgenden auf Proteinebene untersucht. Identisch zur Behandlung der MSC- und AC-Populationen, die für die Microarray-Analyse verwendet worden waren, wurden MSC und AC zunächst nach ihrem jeweiligen Standardprotokoll mit dem für die beiden Zelltypen optimierten Medium expandiert und die AKT-Phosphorylierung der finalen Passage analysiert. Um Inkubationsdauer-abhängige Unterschiede der AKT-Aktivierung auszuschließen wurde der letzte Mediumwechsel der Expansionskultur stets 24 Stunden vor dem Erntezeitpunkt durchgeführt. Die Westernblot-Detektion zeigte, dass alle fünf untersuchten MSC-Populationen durch niedrige, teilweise kaum detektierbare pAKT-Proteinspiegel charakterisiert waren, während die pAKT-Spiegel in AC laut densitometrischer Auswertung über 3000-fach erhöht war (Verhältnis der Bandendichten von pAKT zu β -Aktin: 0,005 in MSC versus 17,21 in AC; Abbildung 6A, B). Als Nächstes wurde untersucht, ob die unterschiedlichen pAKT-Proteinspiegel auf die Verwendung der MSC- oder AC-spezifischen Expansionsmedien zurückzuführen waren, die abweichende Konzentrationen von AKT-Agonisten wie IGF1 oder Insulin als Bestandteile von FCS, Glukose oder FGF2 enthielten (Burke und Vuk-Pavlović 1993; Katoh und Nakagama 2014; Masui et al. 2015; Ryu et al. 2010; Yin et al. 2009). Hierfür wurden im folgenden Experiment zwei unabhängige AC-

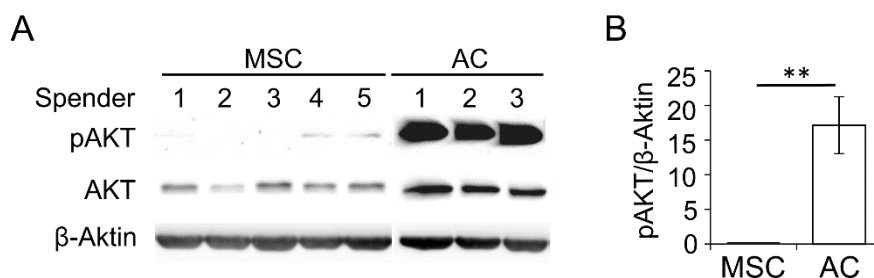


Abbildung 6: Vergleich der AKT-Aktivierung vor Beginn der chondrogenen Re-/Differenzierung von MSC versus AC. (A) MSC und AC wurden nach jeweiligem Standardprotokoll in individuell optimierten Medien expandiert, 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel trypsiniert und jeweils 500.000 Zellen der finalen Passage in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die AKT-Aktivierung wurde mittels Westernblot durch Nachweis von pAKT- und AKT-Proteinspiegeln analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Alle Proben wurden auf dasselbe Gel geladen. (B) Densitometrie des in (A) gezeigten Westernblots: die pAKT-Proteinspiegel wurden auf die Bandendichte von β -Aktin derselben Probe bezogen. Mittelwert \pm SEM; ** $p < 0,01$, studentischer t -Test; $n = 5$ für MSC, $n = 3$ für AC. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger Spenderpopulationen.

Populationen mit MSC-Expansionsmedium kultiviert und die AKT-Phosphorylierung in Zellysaten von MSC und AC am Ende der Expansion verglichen. Auch nach Anpassung des verwendeten Expansionsmediums ergab die Westernblot-Analyse eine signifikant niedrigere AKT-Aktivierung in MSC verglichen zu AC (Abbildung 7A, B). Somit wurde die aus den Microarray-Daten abgeleitete Hypothese, dass MSC mit einer niedrigeren AKT-Aktivierung in die Knorpelneogenese starteten als AC, auf Proteinebene bestätigt. Darüber hinaus war die ungleiche AKT-Aktivierung zu Beginn der Re-/Differenzierung von MSC und AC großteils nicht auf variable Expansionsbedingungen, sondern vermutlich auf zelltypspezifische Unterschiede in der Signalverarbeitung zurückzuführen, die sowohl die pAKT-Induktion als auch Aufrechterhaltung der AKT-Aktivierung kontrollieren.

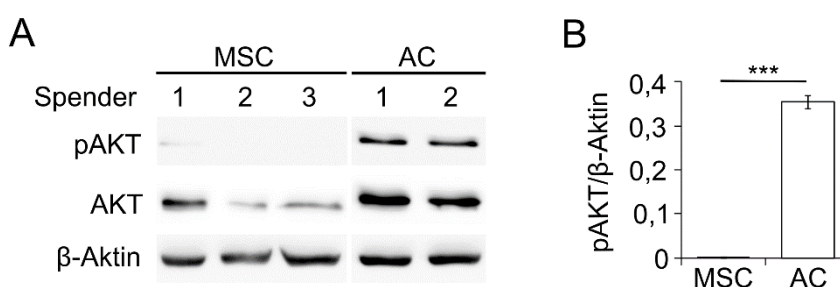


Abbildung 7: Vergleich der AKT-Aktivierung in MSC versus AC vor Beginn der Re-/Differenzierung unter angepassten Kulturbedingungen. (A) MSC und AC wurden bis zur finalen Passage mit MSC-Expansionsmedium in 2D-Kultur expandiert. 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurden die Zellen trypsinisiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die AKT-Aktivierung wurde mittels Westernblot durch Nachweis von pAKT- und AKT-Proteinspiegeln analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Alle Proben wurden auf dasselbe Gel geladen. **(B)** Densitometrie des in (A) gezeigten Westernblots: die pAKT-Proteinspiegel wurden auf die Bandendichte von β-Aktin derselben Probe bezogen. Mittelwerte ± SEM; ***p < 0,001, studentischer t-Test; n = 3 für MSC, n = 2 für AC. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger Spenderpopulationen.

4.3.2 Erhöhung der initialen AKT-Aktivierung durch Insulin und PDGF-BB

Um herauszufinden, ob die niedrigere AKT-Aktivität zu Beginn der MSC-Chondrogenese Auswirkungen auf die frühe chondrogene Differenzierung hat, wurden zunächst geeignete AKT-Agonisten ermittelt, um die initialen pAKT-Proteinspiegel zu erhöhen. Hierfür wurden neben Insulin als Hauptinduktor der AKT-Phosphorylierung auch FGF2 und PDGF-BB als weitere potente AKT-Stimulatoren (Chaudhary und Hruska 2001; Franke et al. 1995; Mossahebi-Mohammadi et al. 2020; Romashkova und Makarov 1999) auf ihr Potential hin untersucht, die AKT-Aktivierung zu Beginn der MSC-Chondrogenese zu erhöhen. Dafür wurden MSC am Ende der Expansionskultur mit FGF2 (4 ng/ml als verwendete Standardkonzentration im MSC-Expansionsmedium, 10 oder 15 ng/ml), Insulin (5, 10 oder 15 µg/ml) oder dem *platelet-derived growth factor* (PDGF)-BB (5, 10 oder 15 ng/ml) behandelt. Die Westernblot-Analyse ergab keine nennenswerte Erhöhung der pAKT-Spiegel nach einer Stunde Behandlung mit 4, 10 oder 15 ng/ml FGF2 im Vergleich zur Kontrolle (serumhaltiges Expansionsmedium ohne

zusätzliche Wachstumsfaktoren) (Abbildung 8A). Nach 24-stündiger FGF2-Behandlung waren die pAKT-Spiegel in zwei von drei Experimenten ebenfalls kaum erhöht (Abbildung 8B) und in einem von drei Experimenten reduziert (Abbildung 8C). Im Gegensatz dazu erhöhten wie erwartet alle drei getesteten Insulinkonzentrationen die AKT-Aktivierung nach 1 Stunde (Abbildung 8A), wobei unter 15 µg/ml Insulin keine weitere Steigerung der pAKT-Spiegel im Vergleich zur 10 µg/ml-Gruppe zu beobachten war. Auch nach 24-stündiger Insulinbehandlung waren die pAKT-Proteinlevel in allen drei unabhängigen Experimenten stark erhöht (Abbildung 8B), wobei in zwei von drei Experimenten bereits eine Konzentration von 5 µg/ml Insulin ausreichte, um die AKT-Phosphorylierung deutlich zu induzieren. In einem von drei Versuchen führte 24-stündige Behandlung mit 10 µg/ml Insulin zur stärksten pAKT-Induktion (Abbildung 8C). Auch unter PDGF-BB-Behandlung war die AKT-Aktivierung nach 1 Stunde dosisabhängig erhöht, wobei durch 50 ng/ml PDGF-BB verglichen zur 15 ng/ml-Gruppe keine weitere Steigerung der AKT-Phosphorylierung erreicht wurde (Abbildung 8A). Eine 24-stündige PDGF-BB-Behandlung hatte in zwei von drei Experimenten keinen Effekt auf AKT-Aktivierung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 8B), wohingegen in einem von drei Versuchen die durch 15 ng/ml PDGF-BB induzierten pAKT-Proteinspiegel nach 24 Stunden sogar höher waren als in der mit 10 µg/ml Insulin behandelten Gruppe (Abbildung 8C). Anhand dieser Ergebnisse

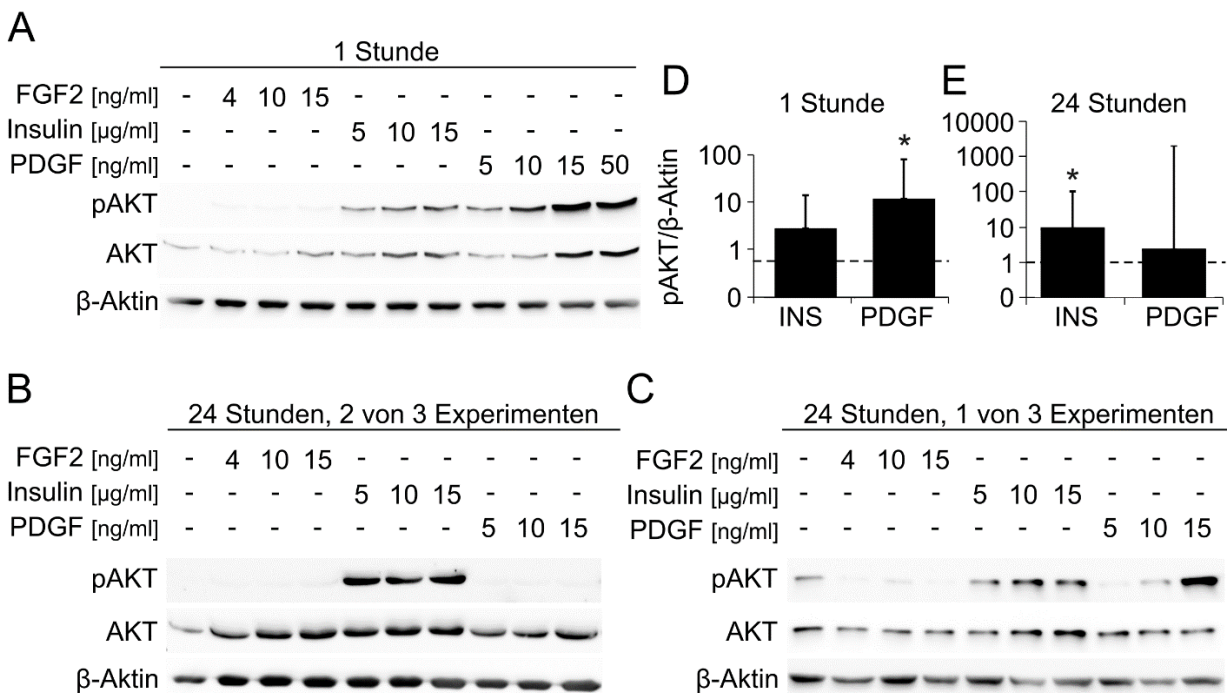


Abbildung 8: Stimulation der pAKT-Proteinspiegel am Ende der MSC-Expansion mit FGF2, Insulin und PDGF-BB. Expandierte MSC wurden am Ende der Expansionskultur für 1 (A) oder 24 (B, C) Stunden mit FGF2, Insulin oder PDGF-BB in den angegebenen Konzentrationen behandelt (A, B, C) Die pAKT- und AKT-Proteinspiegel wurden mittels Westernblot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die gezeigten Westernblot-Detektionen sind repräsentativ für A: n = 3, B: n = 2, C: n = 1. (D, E) Densitometrische Auswertung: die pAKT-Proteinspiegel nach 1- oder 24-stündiger Behandlung mit 10 µg/ml Insulin oder 15 ng/ml PDGF-BB wurden auf die Bandendichte von β-Aktin derselben Probe bezogen. Dargestellt werden die Mediane ± 95% Konfidenzintervall. Die Kontrollgruppe (ohne zusätzliche Wachstumsfaktoren) wurde auf 1 gesetzt (unterbrochene Linie). * p < 0,05, MWU. D: n = 4, E: n = 5. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger Spenderpopulationen pro Zeitpunkt.

wurden 10 µg/ml Insulin und 15 ng/ml PDGF-BB für die folgenden Experimente gewählt, um die initiale AKT-Aktivierung zu Beginn der MSC-Chondrogenese zu erhöhen. Laut Auswertung von insgesamt vier unabhängigen Versuchen führte 15 ng/ml PDGF-BB nach einer Stunde im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten pAKT-Stimulation, die im Trend 5,9-fach stärker schien als in der mit 10 µg/ml Insulin behandelten Gruppe (Abbildung 8D). Nach 24 Stunden allerdings waren die pAKT-Spiegel unter 10 µg/ml Insulin im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht, während die AKT-Aktivierung unter PDGF-BB nicht reproduzierbar gesteigert war (Abbildung 8E). Die beiden Agonisten schienen AKT also mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zu induzieren, wobei PDGF-BB zu einer schnellen und Insulin zu einer langsamen Induktion der pAKT-Spiegel führte. Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass FGF2-Behandlung die pAKT-Spiegel von MSC kaum beeinflusste, während die AKT-Phosphorylierung durch PDGF-BB kurzfristig und durch Insulin eher längerfristig stimuliert wurde.

4.3.3 Effekte erhöhter initialer pAKT-Spiegel auf die frühe MSC-Chondrogenese

Um herauszufinden, ob die niedrigere AKT-Aktivität zu Beginn der MSC-Chondrogenese Auswirkungen auf die frühe chondrogene Differenzierung hat, wurden MSC für die letzten 24 Stunden der Expansion mit den AKT-Induktoren Insulin (10 µg/ml) oder PDGF-BB (15 ng/ml) behandelt, worauf eine 7-tägige 3D-Pelletkultur unter chondrogenen Standardbedingungen folgte. Da nach einer Behandlungsdauer von nur 24 Stunden vor Beginn der chondrogenen 3D-Kultur zu erwarten war, dass Differenzierungseffekte mit fortschreitender Kulturdauer immer schwerer zu identifizieren wären, wurde Tag 7 der Chondrogenese als früher Analysezeitpunkt gewählt. Um zu berücksichtigen, dass GAG zu frühen Zeitpunkten der MSC-Chondrogenese durch das Fehlen stabilisierender Kollagen-Fasern in das umgebende Medium ausgespült werden können, wurden neben den abgelagerten GAG im Pellet auch die freigesetzten GAG im Überstand bestimmt. Während der GAG-Gehalt pro Pellet an Tag 7 in der Insulin-Gruppe im Trend 1,3-fach erhöht war, hatte die kurze Vorbehandlung mit PDGF-BB keinen Effekt auf die Proteoglykanablagerung bis Tag 7 (1,1-fach) und auch der GAG-Gehalt im Überstand blieb durch beide Behandlungen im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abbildung 9A). Allerdings reduzierten beide Behandlungen den DNA-Gehalt pro Pellet signifikant (Insulin: - 26%; PDGF-BB: - 37%; Abbildung 9B), was auf eine geringere Zellzahl schließen ließ. Bezogen auf die DNA war der GAG-Gehalt im Pellet sowie im Überstand teilweise deutlich erhöht, sodass der höhere Gesamt-GAG-Gehalt in beiden Gruppen Signifikanz erreichte (Abbildung 9C). Diese Daten zeigten, dass eine erhöhte AKT-Aktivierung zu Beginn der MSC-Chondrogenese unabhängig von der Aktivierungskinetik zwar einerseits den Zellverlust verstärkte, andererseits aber zu einer erhöhten Proteoglykanablagerung in der verbleibenden Zellpopulation führte.

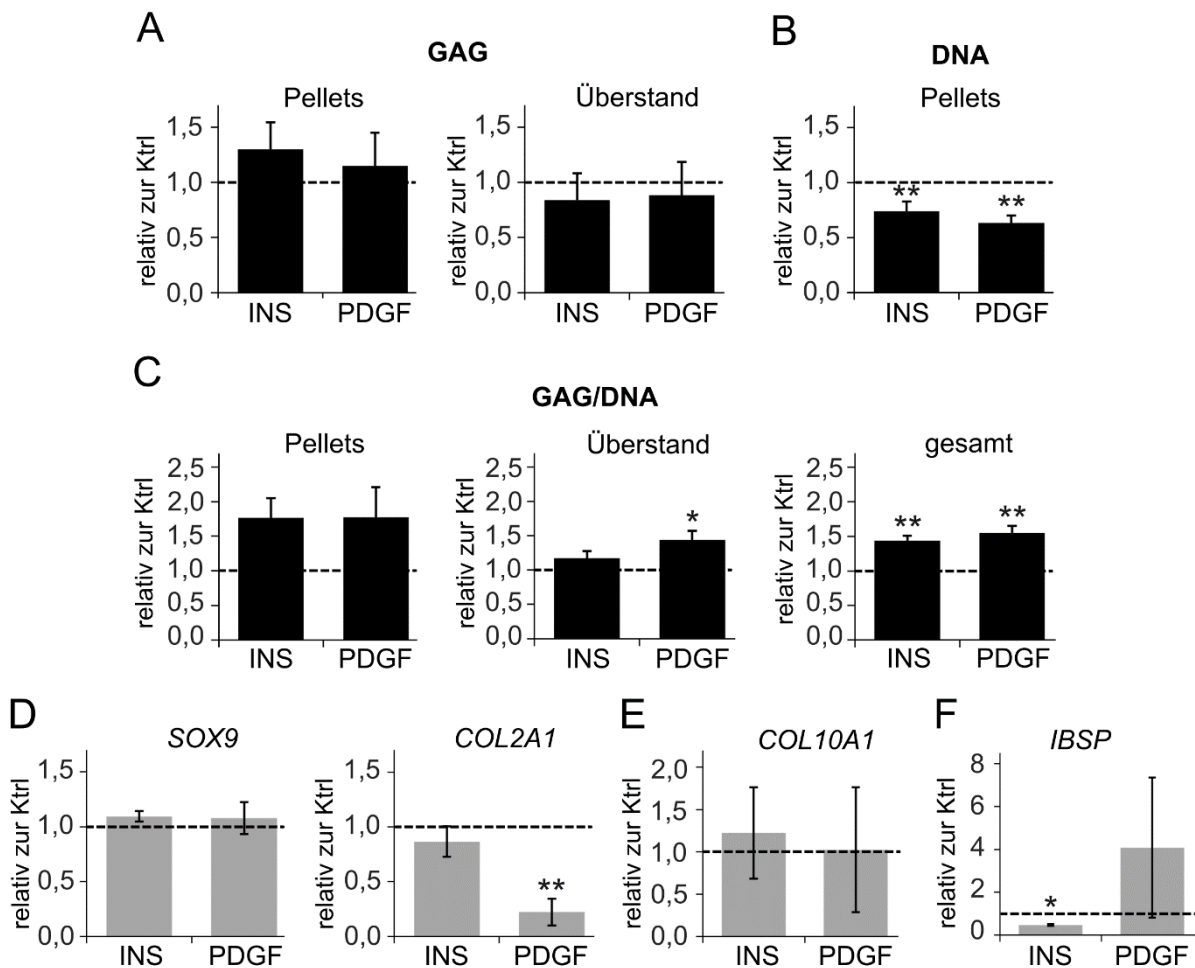


Abbildung 9: Effekt von Insulin- und PDGF-BB-Behandlung am Ende der Expansion auf die frühe chondrogene Differenzierung. Nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µg/ml Insulin oder 15 ng/ml PDGF-BB vor Beginn der Knorpelneogenese wurden MSC unter chondrogenen Bedingungen für 7 Tage als 3D-Pellets kultiviert. **(A)** Bestimmung des GAG-Gehalts in Pellets sowie im Zellkulturüberstand mittels DMMB-Assay; INS, PDGF: n = 4. **(B)** DNA-Gehalt pro Pellet via PicoGreen-Assay; INS, PDGF: n = 4. **(C)** Der GAG-Gehalt pro Pellet, im Zellkulturüberstand oder in Pellet + Überstand (gesamt) wurde auf den DNA-Gehalt desselben Pellets bezogen; INS, PDGF: n = 4. **(D, E, F)** Genexpressionsanalyse für die chondrogenen Marker *SOX9* und *COL2A1*, den hypertrophen Marker *COL10A1* sowie den osteogenen Marker *IBSP* mit *CPSF6* und *RPL13* als Referenzgenen an Tag 7. Mittelwerte ± SEM; INS: n = 4, PDGF: n = 3. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt (unterbrochene Linie). * p < 0,05, ** p < 0,01, MWU; n = 4 unabhängige Spenderpopulationen.

Während die mRNA-Spiegel des chondrogenen Transkriptionsfaktors *SOX9* an Tag 7 von Vorbehandlung mit Insulin oder PDGF-BB unberührt blieben, war die *COL2A1*-Expression in der Insulin-Gruppe im Trend (-13%) und in der PDGF-BB-Gruppe signifikant reduziert (-77%), was zeigte, dass eine kurzzeitige AKT-Stimulation zusätzlich zu GAG/DNA andere chondrogene Marker nicht stimulierte (Abbildung 9D). Bei unveränderten *COL10A1*-Spiegeln nach beiden Vorbehandlungen (Abbildung 9E) war der osteogene Marker *IBSP* in der Insulin-Gruppe signifikant reduziert (Abbildung 9F). Somit schien erhöhte AKT-Aktivierung MSC zumindest in Bezug auf die untersuchten Marker *COL10A1* und *IBSP* nicht stärker in die enchondrale Richtung zu lenken. Zusammenfassend erreichte eine Erhöhung der initialen AKT-Aktivierung vor allem eine gesteigerte GAG-Bildung der verbleibenden chondrogen differenzierenden MSC

und ließ die frühe enchondrale Differenzierung größtenteils unbeeinflusst. Somit schien die niedrige AKT-Aktivierung zu Beginn der MSC-Chondrogenese in erster Linie die frühe GAG-Ablagerung zu beeinträchtigen, die enchondrale Differenzierungsrichtung von MSC aber nicht zu verantworten.

4.4 AKT-Aktivierung während der frühen MSC-Chondrogenese bis Tag 7

Da bereits vor Beginn der *In-vitro*-Knorpelneogenese eine zellintrinsisch unterschiedliche AKT-Aktivierung in MSC und AC beobachtet wurde, stellte sich als nächstes die Frage, ob sich die gefundenen Unterschiede in der AKT-Signalwegaktivierung auch in der chondrogenen 3D-Kultur fortsetzen würden. Da chondrogene Medien neben Insulin auch TGF β 1 und Dexamethason enthalten und für beide Komponenten je nach Zellkontext sowohl als AKT-stimulierende oder -inhibierende Effekte beschrieben wurden (Fujita et al. 2004; Valderrama-Carvajal et al. 2002), sollte zunächst ermittelt werden, wie sich die Behandlung mit TGF β 1 oder Dexamethason auf die AKT-Phosphorylierung in chondrogen induzierten MSC auswirkte.

4.4.1 Verlauf der AKT-Phosphorylierung in chondrogen induzierten MSC-Pellets an Tag 1

Um einen geeigneten Erntezeitpunkt für die Untersuchung der TGF β 1- oder Dexamethason-Effekte auf die AKT-Phosphorylierung zu bestimmen, wurde die Kinetik der AKT-Aktivierung durch chondrogenes Medium an Tag 1 der Chondrogenese in zwei unabhängigen MSC-Populationen bestimmt. In beiden Experimenten wurde eine Induktion der AKT-Phosphorylierung bereits 15 Minuten nach Mediumwechsel nachgewiesen (Abbildung 10A, B). Während in Experiment 1 die AKT-Phosphorylierung nach einer Stunde eine Klimax mit anschließender Plateauphase bis mindestens 24 Stunden nach Mediumwechsel erreichte (Abbildung 10A), nahm der pAKT-Proteinspiegel in Experiment 2 bereits nach einer Stunde sukzessive ab (Abbildung 10B). In Pellets beider MSC-Populationen wurde AKT-Aktivierung zwischen 24 und 48 Stunden nach Mediumwechsel deutlich reduziert. Da in beiden Experimenten die maximale AKT-Phosphorylierung nach 60 Minuten erreicht wurde, erwies sich diese Stimulationsdauer als optimaler Erntezeitpunkt für die folgenden Experimente, um potentielle TGF β - oder Dexamethason-Effekte auf pAKT-Level detektieren zu können.

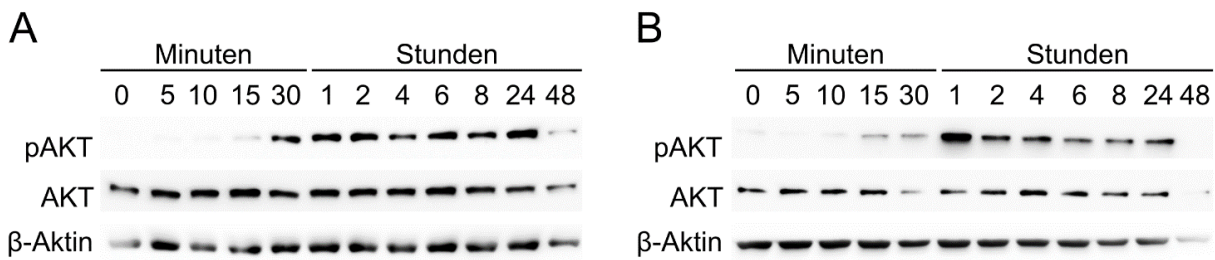


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der AKT-Aktivierung an Tag 1 der MSC-Chondrogenese. (A, B) MSC-Pellets wurden mit chondrogenem Medium (inkl. 6,25 µg/ml Insulin, 10 ng/ml TGFβ1 und 100 nM Dexamethason) behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlungsstart in flüssigem Stickstoff geerntet. Die pAKT- und AKT-Proteinspiegel wurden in Proteinlysaten mittels Westernblot bestimmt. β-Aktin diente als Ladekontrolle; n = 2 unabhängige MSC-Populationen.

4.4.2 Effekt von TGFβ1 und Dexamethason auf Insulin-induzierte AKT-Phosphorylierung an Tag 1 der MSC-Chondrogenese

Der Effekt von TGFβ1 bzw. Dexamethason auf die AKT-Phosphorylierung in chondrogen induzierten MSC wurde untersucht, indem 3D-Pellets von unabhängigen MSC-Populationen an Tag 1 der Chondrogenese für 1 Stunde mit chondrogenem Medium mit oder ohne Insulin (6,25 µg/ml), TGFβ1 (10 ng/ml) oder variablen Dexamethason-Konzentrationen (0 nM, 10 nM, 100 nM als Standardkonzentration im chondrogenen Medium oder 1 µM) behandelt wurden. In allen drei unabhängigen Spenderpopulationen führte Insulin wie erwartet zu einer starken pAKT-Induktion (Abbildung 11A, B). In zwei von drei Experimenten blieben die pAKT-Proteinspiegel nach 1-stündiger TGFβ-Behandlung sowohl in An- als auch Abwesenheit von Insulin unverändert (Abbildung 11A) und wurden in einem von drei Experimenten im Vergleich zum Stimulationsbeginn (0 Stunden) sogar reduziert (Abbildung 11B). Somit führte TGFβ1 in chondrogen stimulierten MSC nach 1-stündiger Behandlung nicht zur Erhöhung der pAKT-

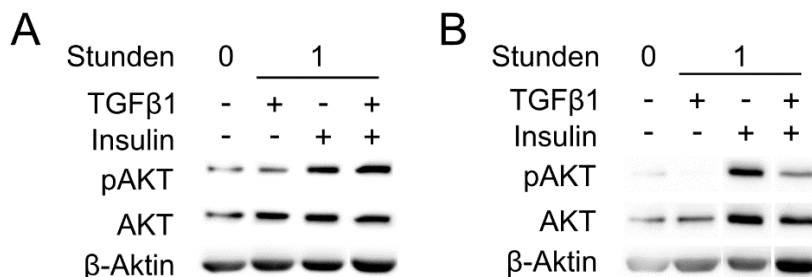


Abbildung 11: Effekt von Insulin und TGFβ1 auf die AKT-Phosphorylierung an Tag 1 der MSC-Chondrogenese. MSC-Pellets wurden an Tag 1 der Chondrogenese für 1 Stunde mit chondrogenem Medium (inkl. 100 nM Dexamethason) mit/ohne Insulin oder TGFβ1 behandelt. Die pAKT- und AKT-Proteinspiegel wurden mittels Westernblot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. **(A)** Gezeigt wird eines von zwei Experimenten, in denen TGFβ1 die pAKT-Proteinspiegel nicht beeinflusste. **(B)** In diesem dritten Versuch führte TGFβ1-Behandlung zu reduzierten pAKT-Proteinspiegeln. Alle Proben wurden auf dasselbe Gel geladen und das Experiment in insgesamt drei unabhängigen Spenderpopulationen wiederholt (n = 3).

Spiegel, sondern hatte spenderabhängig keinen oder einen leicht reduzierenden Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung.

Um den Effekt von Dexamethason auf die AKT-Aktivierung in chondrogen induzierten MSC zu untersuchen, wurden MSC-Pellets zunächst an Tag 0 für 0,5 Stunden mit 100 nM Dexamethason (Dex), 6,25 µg/ml Insulin oder beiden Medienzusätzen in Kombination behandelt. Im Gegensatz zu Insulin führte Dexamethason in zwei unabhängigen MSC-Populationen nicht zu einer Erhöhung der pAKT-Spiegel (Abbildung 12A). Nach 24-stündiger Kultivierung von MSC-Pellets mit chondrogenem Medium, das 0 nM, 10 nM, 100 nM (als Standardkonzentration im chondrogenen Medium) oder 1 µM Dexamethason enthielt, waren die basalen pAKT-Spiegel in zwei unabhängigen Spenderpopulationen dosisabhängig erhöht, wobei unter 1000 nM Dexamethason keine deutliche Steigerung im Vergleich zur 100-nM-Gruppe erkennbar war (Abbildung 12B). Eine 1-stündige Behandlung der Pellets mit gruppenspezifischem Medium an Tag 1 hingegen führte unabhängig von der verwendeten Dexamethason-Konzentration zu vergleichbaren pAKT-Proteinspiegeln (Abbildung 12B).

Somit wurde gezeigt, dass die Induktion der AKT-Phosphorylierung durch Insulin als wichtigstem AKT-Agonisten des chondrogenen Mediums nicht nennenswert von Dexamethason beeinflusst wurde. Inhibierende TGFβ-Effekte auf die pAKT-Proteinspiegel traten in manchen Versuchen auf und konnten folglich nicht *per se* ausgeschlossen werden.

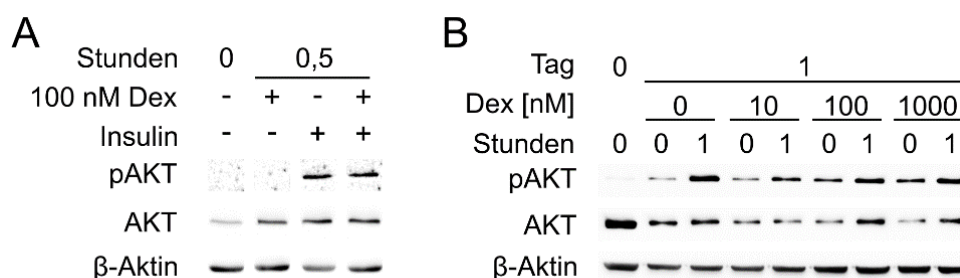


Abbildung 12: Effekt von Dexamethason auf die Phosphorylierung von AKT zu Beginn der MSC-Chondrogenese. (A) Pellets expandierter MSC wurden an Tag 0 für 0,5 Stunden mit 100 nM Dexamethason (Dex), 6,25 µg/ml Insulin oder beiden Medienzusätzen in Kombination behandelt. (B) MSC-Pellets wurden zunächst für 24 Stunden in chondrogenem Medium kultiviert, das die angegebenen Dexamethason-Konzentrationen enthielt, bevor sie an Tag 1 für eine weitere Stunde mit den entsprechenden gruppenspezifischen Medien stimuliert wurden. (A, B) Die Proteinspiegel von pAKT und AKT wurden mittels Westernblot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Alle Proben wurden auf dasselbe Gel geladen. A: n = 1, B: n = 2 unabhängige MSC-Populationen.

4.4.3 Vergleich der AKT-Aktivierung von MSC und AC in der frühen 3D-Pelletkultur

Bezüglich der AKT-Aktivierung an Tag 1 ergaben vier direkte Vergleiche auf derselben Westernblot-Membran etwa 11-fach niedrigere pAKT-Spiegel in MSC als in AC (Abbildung 13A, B). Um herauszufinden, ob sich auch die kurzfristige Insulinantwort von MSC und AC unterschied, wurden Pellets beider Zelltypen an Tag 1 für eine Stunde mit chondrogenem Medium behandelt und die AKT-Aktivierung in Zelllysaten bestimmt. Zwei direkte Vergleiche auf derselben

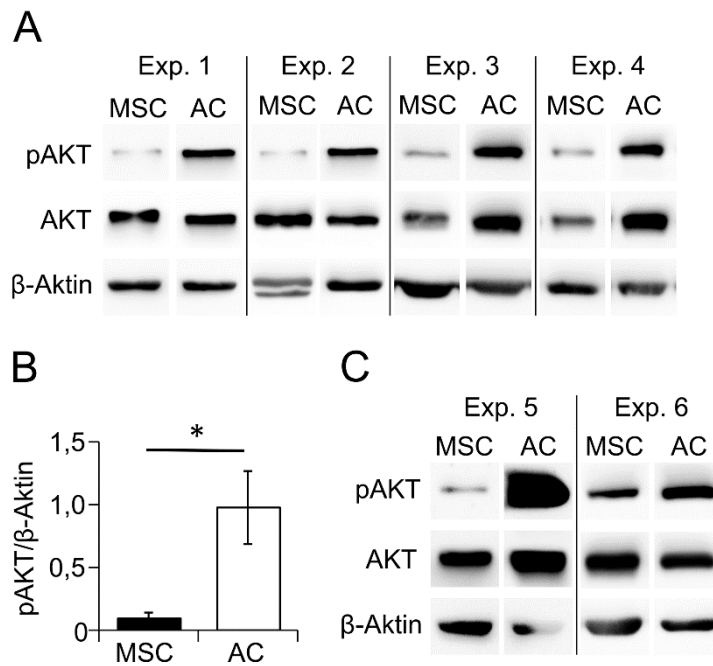


Abbildung 13: Vergleich der AKT-Aktivierung in MSC versus AC an Tag 1 der Knorpelneogenese. (A, C) MSC- oder AC-Pellets wurden an Tag 1 der 3D-Kultur 24 Stunden (A, B) oder 1 Stunde (C) nach Mediumwechsel in flüssigem Stickstoff geerntet. Die AKT-Aktivierung durch Nachweis von pAKT-Proteinspiegeln in Zelllysaten von MSC- und AC-Pellets wurde auf derselben Westernblotmembran in je vier (A, n = 4) oder zwei (C, n = 2) unabhängigen Experimenten direkt miteinander verglichen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. **(B)** Densitometrie der in (A) gezeigten Westernblots: die pAKT-Proteinspiegel wurden auf Bandendichte von β-Aktin derselben Probe bezogen. Mittelwerte ± SEM, *p < 0,05, studentischer t-Test. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger Zellpopulationen für MSC und AC. Exp. 1 und Exp. 5 beziehungsweise Exp. 2 und Exp. 6 wurden mit identischen MSC- und AC-Populationen durchgeführt.

Westernblot-Membran zeigten deutlich niedrigere pAKT-Proteinspiegel in MSC versus AC nach 1-stündiger Behandlung (Abbildung 13C), was auf eine unterschiedliche Sensitivität der beiden Zelltypen schließen ließ.

Im weiteren Verlauf der 3D-Kultur war die AKT-Aktivierung an Tag 3 (48 Stunden nach Mediumwechsel) in beiden Zelltypen auf vergleichbarem Niveau und erreichte an Tag 5 sogar höhere Level in MSC als in AC (Abbildung 14A). Nach kurzfristiger Insulinstimulation für eine Stunde an Tag 3 waren die pAKT-Proteinspiegel in beiden unabhängigen Experimenten in MSC niedriger als in AC, erreichten aber an Tag 5 vergleichbare Level (Abbildung 14B). Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass MSC unmittelbar zu Beginn der 3D-Kultur sowohl auf einen kurzfristigen als auch längeren Insulinstimulus mit schwächerer AKT-Aktivierung reagierte als AC. Mit zunehmender Kulturdauer jedoch glich sich die Dynamik der AKT-Signalwegaktivierung in MSC und AC einander an, so dass die kurzfristige Insulinantwort in beiden Zelltypen vergleichbar war. Dies legte nahe, dass sowohl MSC als auch AC die Aktivierung des AKT-Signalweges unter chondrogenen Re-/Differenzierungsbedingungen bereits früh nach Induktion der Knorpelneogenese *in vitro* anpassten.

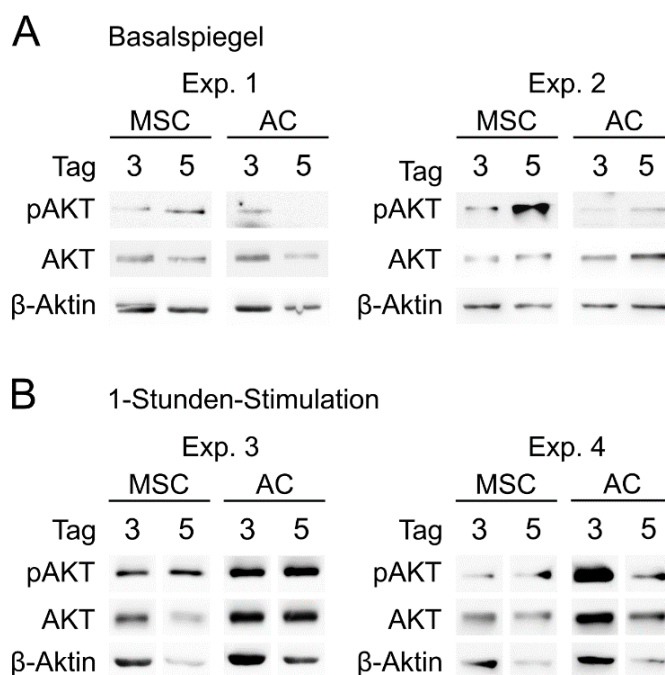


Abbildung 14: Vergleich der AKT-Aktivierung an Tag 3 und 5 der MSC-Chondrogenese bzw. AC-Redifferenzierung. MSC- und AC-Pellets wurden an Tag 3 und 5 der 3D-Kultur 48 Stunden nach dem Mediumwechsel geerntet (A) oder für 1 Stunde mit chondrogenem Medium stimuliert (B). Die AKT-Aktivierung durch Nachweis von pAKT-Proteinspiegeln in Zelllysaten von MSC- und AC-Pellets wurde auf derselben Westernblotmembran in je zwei unabhängigen Experimenten direkt miteinander verglichen. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Exp. 1 und Exp. 3 beziehungsweise Exp. 2 und Exp. 4 wurden mit identischen MSC- und AC-Populationen durchgeführt. N = 2 unabhängige Spenderpopulationen für MSC und AC.

4.4.4 Effekte von Insulin- und PDGF-BB-Behandlung bis Tag 7 der MSC-Chondrogenese

Um die Auswirkungen der an frühen Zeitpunkten niedrigen AKT-Aktivierung in MSC für die chondrogene Differenzierung zu untersuchen, zielte die folgende Versuchsreihe darauf ab, die AKT-Aktivität während der frühen MSC-Chondrogenese unter Standardinsulinbehandlung zu erhöhen. Hierfür wurde versucht, den AKT-Signalweg in zwei unabhängigen Versuchsreihen mit insgesamt vier AKT-Induktoren stärker zu induzieren als durch die im chondrogenen Medium verwendete Standardinsulin-Konzentration von 6,25 µg/ml. Da eine Vorbehandlung mit den AKT-Agonisten Insulin und PDGF-BB am Ende der MSC-Expansion bereits leichte Effekte in Form von gesteigerter GAG-Ablagerung erzielte, wurden in der ersten Versuchsreihe MSC in Expansion zunächst wie zuvor beschrieben für die finalen 24 Stunden mit 10 µg/ml Insulin oder 15 ng/ml PDGF-BB vorbehandelt. In der anschließenden 3D-Kultur wurden die Pellets der Insulin-Gruppe mit einer im Vergleich zur Standardkonzentration erhöhten Insulindosis von 10 µg/ml kultiviert (in Abbildung 15 als „Ins“ bezeichnet), während die Pellets der PDGF-BB-

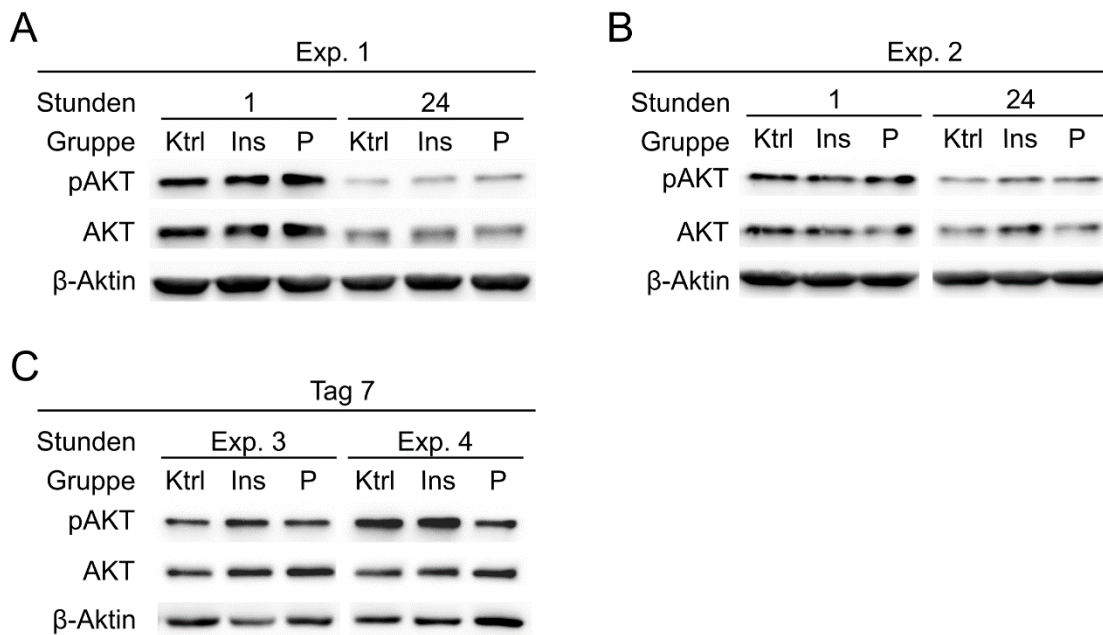


Abbildung 15: Effekt von Insulin- oder PDGF-BB-Behandlung auf die pAKT-Proteinspiegel in der frühen MSC-Chondrogenese. MSC wurden für die finalen 24 Stunden am Ende der Expansion und bis Tag 7 der Pelletkultur entweder mit einer erhöhten Insulinkonzentration von 10 µg/ml (Ins) oder zusätzlich zur Standardinsulinkonzentration mit 15 ng/ml PDGF-BB (P) behandelt. Die Zellen der Kontrollgruppe (Ktrl) erhielten keine Vorbehandlung in der Expansion und wurden in 3D-Kultur mit der Standardinsulinkonzentration von 6,25 µg/ml kultiviert. **(A, B, C)** Westernblot-Analyse von pAKT- und AKT-Proteinspiegeln nach 1-stündiger Behandlung an Tag 0 bzw. nach 24-stündiger Behandlung an Tag 1 (A, B) oder 48 Stunden nach Mediumwechsel an Tag 7 (C). β-Aktin diente als Ladekontrolle. Jedes Experiment wurde mit einer unabhängigen MSC-Population durchgeführt; n = 2 für jeden untersuchten Zeitpunkt.

Gruppe zusätzlich zur Standardinsulinkonzentration mit 15 ng/ml PDGF-BB („P“) behandelt wurden. Die Westernblot-Analyse zweier unabhängiger Experimente ergab, dass die pAKT-Proteinspiegel nach 1-stündiger Behandlung an Tag 0 weder durch eine erhöhte Insulindosis von 10 µg/ml noch durch zusätzlich 15 ng/ml PDGF-BB im Vergleich zur Standardinsulinbehandlung (Kontrolle) erhöht waren (Abbildung 15A, B). Während die AKT-Phosphorylierung nach 24-stündiger Behandlung an Tag 1 sowohl in der Insulin- als auch in der PDGF-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle mit Standardinsulinkonzentration marginal gesteigert waren, war diese Erhöhung 48 Stunden nach Mediumwechsel an Tag 7 in zwei weiteren unabhängigen Experimenten nicht evident (Abbildung 15C). Dies zeigte, dass die im chondrogenen Medium verwendete Insulinkonzentration von 6,25 µg/ml die AKT-Phosphorylierung bereits so stark induzierte, dass eine höhere Insulindosis oder zusätzliches PDGF-BB die pAKT-Induktion kaum steigern konnte. Trotz dieser nur schwachen Steigerung der pAKT-Spiegel führten beide Behandlungen bis Tag 7 zu einem leicht reduzierten GAG-Gehalt im Pellet (Insulin, PDGF-BB: - 14%, $p > 0,05$) und im Überstand (Insulin: - 12%, $p > 0,05$; PDGF-BB: - 16%, $p \leq 0,05$; Abbildung 16A). Vergleichbar zu den beobachteten Effekten nach Vorbehandlung alleine war der DNA-Gehalt in der Insulin-Gruppe signifikant, in der PDGF-BB-Gruppe im Trend reduziert (Abbildung 16B), was das Gesamt-GAG/DNA-Verhältnis an Tag 7 in beiden Gruppen leicht

erhöhte (Insulin: 1,54-fach, $p < 0,05$; PDGF-BB: 1,45-fach, $p > 0,05$; Abbildung 16C). Während die mRNA-Spiegel des chondrogenen Markers *SOX9* wie zuvor unverändert blieben, war die *COL2A1*-Expression in beiden Gruppen im Trend leicht erhöht (Abbildung 16D), was vor allem für PDGF-BB einen Gegensatz zu 24-stündiger Vorbehandlung in der Expansion darstellte und nachteilige Effekte somit gerettet wurden. *COL10A1* als Marker für hypertrophe Differenzierung wurde im Vergleich zur Kontrolle weder von Insulin- noch PDGF-BB-Behandlung beeinflusst (Abbildung 16E), wohingegen der osteogene Marker *IBSP* in der Insulin-Gruppe im Trend wieder reduziert war (Abbildung 16F). Zusammenfassend war jedoch eine kontinuierliche Behandlung mit erhöhter Insulinkonzentration oder PDGF-BB zusätzlich zur Standardinsulinkonzentration bis Tag 7 trotz leichter Steigerung der GAG/DNA-Menge aufgrund des erhöhten Zellverlustes nicht zielführend, um die Chondrogenese von MSC zu verbessern.

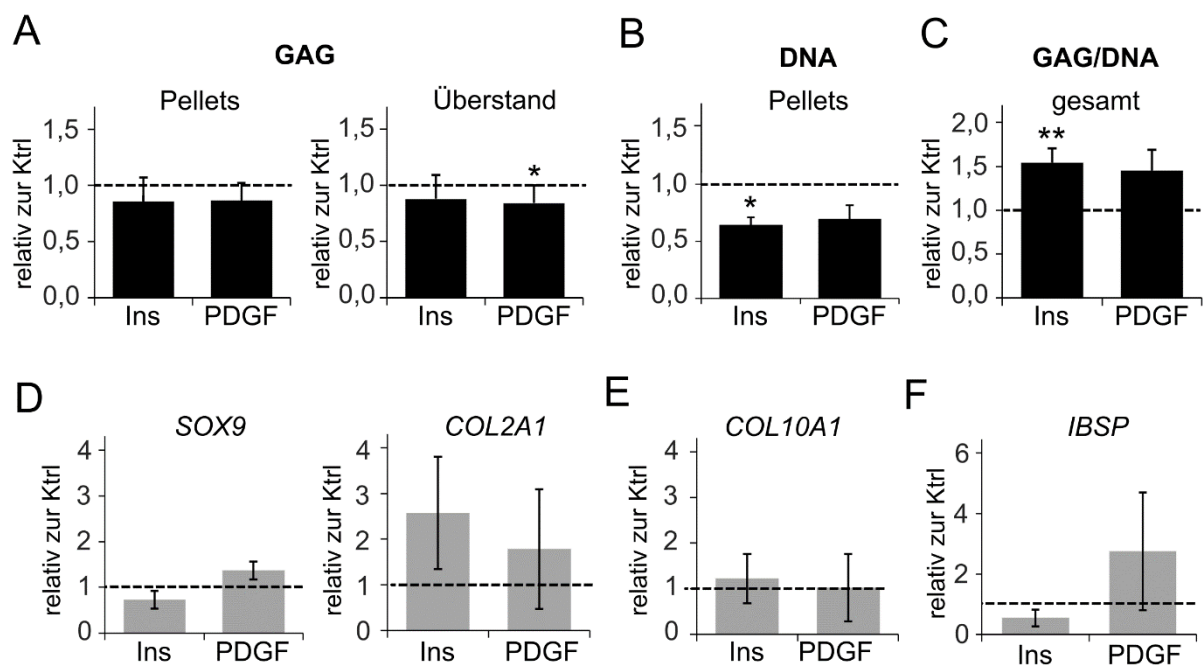


Abbildung 16: Effekt von Insulin- oder PDGF-BB-Behandlung auf die frühe MSC-Chondrogenese. MSC wurden für die finalen 24 Stunden am Ende der Expansion und bis Tag 7 der Pelletkultur entweder mit einer erhöhten Insulinkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ (INS) oder zusätzlich zur Standardinsulinkonzentration mit 15 ng/ml PDGF-BB (PDGF) behandelt. Die Zellen der Kontrollgruppe (Ktrl, unterbrochene Linie) erhielten keine Vorbehandlung in der Expansion und wurden in 3D-Kultur mit der Standardinsulinkonzentration von 6,25 $\mu\text{g/ml}$ kultiviert. (A, B) In Tag-7-Pellets wurde der GAG-Gehalts mittels DMMB und der DNA-Gehalt mittels PicoGreen bestimmt; $n = 4 - 5$. (C) Normalisierung des GAG-Gehalts von Tag-7-Pellets auf DNA; $n = 4 - 5$. (D, E, F) Genexpressionsanalyse für die chondrogenen Marker *SOX9* und *COL2A1*, den hypertrophen Marker *COL10A1* und den osteogenen Marker *IBSP* mit *CPSF6* und *RPL13* als Referenzgenen an Tag 7; $n = 4 - 5$. Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; MWU. N-Angaben beziehen sich auf die jeweiligen Experimente mit unabhängigen MSC-Populationen pro Gruppe.

Im Folgenden wurden zwei weitere anabole Wachstumsfaktoren und bekannte AKT-Induktoren auf ihr Potential hin untersucht, die Insulin-induzierte AKT-Aktivität während der MSC-Chondrogenese zu steigern. Getestet wurde IGF1, das in humanen AC und MSC sowie bovinen Knorpelimplantaten die Proteoglykansynthese oder -ablagerung steigerte (Fischer et

al. 2018; Luyten et al. 1988; Starkman et al. 2005). Als zweiter Wachstumsfaktor wurde LR3-IGF (*engl.* Long Arginine(R) 3-IGF1) verwendet, ein synthetisches, verlängertes IGF-Analogon. Es unterscheidet sich von der nativen Sequenz des humanen IGF1-Peptids dadurch, dass Glutaminsäure (E) an Position Nr. 3 seiner Aminosäuresequenz durch Arginin (R) ersetzt und der N-Terminus um 13 Aminosäuren verlängert wurde. Durch diese Modifikationen soll LR3-IGF einerseits sowohl seine Affinität als auch sein Aktivierungspotential für den IGF1R behalten, andererseits aber weniger anfällig für Inhibition durch IGF-Bindeproteine sein (Ballard et al. 1987). Um für humane MSC unter chondrogenen Bedingungen zunächst zu testen, ob und in welchem Ausmaß IGF1 oder LR3-IGF die AKT-Phosphorylierung im Vergleich zu Insulin induzieren können, wurden MSC an Tag 0 der Chondrogenese für eine Stunde entweder mit der Standardinsulinkonzentration von 6,25 µg/ml (\cong 1,07 µM), 100 ng/ml (\cong 13,1 nM) IGF1 oder 3,5 nM LR3-IGF behandelt. Die Wahl der LR3-IGF-Konzentration orientierte sich an seiner spezifischen Wirkdosis von $ED_{50} = 1,1$ nM sowie Studien mit Muskelzelllinien aus Ratte und Schwein bzw. einer Epithelzelllinie aus Ratte (Pampusch et al. 2005; Song et al. 2003; Xi et al. 2007). Laut Westernblot-Detektion erhöhte IGF1-Behandlung verglichen zur Kontrolle ohne zusätzlichen AKT-Agonisten die pAKT-Proteinspiegel nur marginal (Abbildung 17A). LR3-IGF induzierte AKT-Phosphorylierung zwar stärker als IGF1, blieb aber deutlich unter dem durch Insulin-Behandlung erreichten pAKT-Niveau (Abbildung 17A). Um additive Effekte von IGF1 oder LR3-IGF auf die Insulin-induzierten pAKT-Level zu untersuchen, wurden MSC-Pellets zunächst an Tag 0 der Chondrogenese mit der Standardinsulinkonzentration von 6,25 µg/ml allein oder in Kombination mit entweder 100 ng/ml IGF1 oder 3,5 nM LR3-IGF behandelt. Nach 1-stündiger Ko-Behandlung mit Insulin erschienen die pAKT-Spiegel sowohl unter IGF1 als auch LR3-IGF leicht reduziert (Abbildung 17B). An Tag 7 waren die pAKT-Spiegel unter IGF1 oder LR3-IGF unverändert, Gesamt-AKT-Protein schien verglichen zur Kontrolle allerdings in beiden Gruppen leicht reduziert (Abbildung 17C). Nach 7-tägiger Behandlung war der GAG-Gehalt in der IGF1-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 36% reduziert, unter LR3-IGF-Behandlung hingegen leicht um 30% erhöht (Abbildung 17D). Ein unter IGF1 leicht und unter LR3-IGF signifikant reduzierter DNA-Gehalt ließ wie bereits bei PDGF-BB-Behandlung und erhöhter Insulinkonzentration auf eine verringerte Zellzahl pro Pellet schließen (Abbildung 17E). Das GAG/DNA-Verhältnis war in der IGF1-Gruppe im Trend reduziert, für LR3-IGF aber signifikant erhöht, was darauf hindeuten könnte, dass IGF-BPs an den negativen IGF1-Effekten beteiligt sein könnten (Abbildung 17F). Zusammenfassend schien die niedrige AKT-Aktivierung in der frühen MSC-Chondrogenese die GAG-Ablagerung zu beeinträchtigen, wobei die frühe Überstimulation von AKT möglicherweise eine Selektion von Zellen mit vermehrter Proteoglykanablagerung bewirkte. Im Kontext der frühen enchondralen Differenzierung schien die Behandlung mit erhöhter Insulinkonzentration im Gegensatz zu PDGF-BB einen leicht anti-osteogenen Effekt zu erzielen, der sich in einer reduzierten *IBSP*-Expression äußerte.

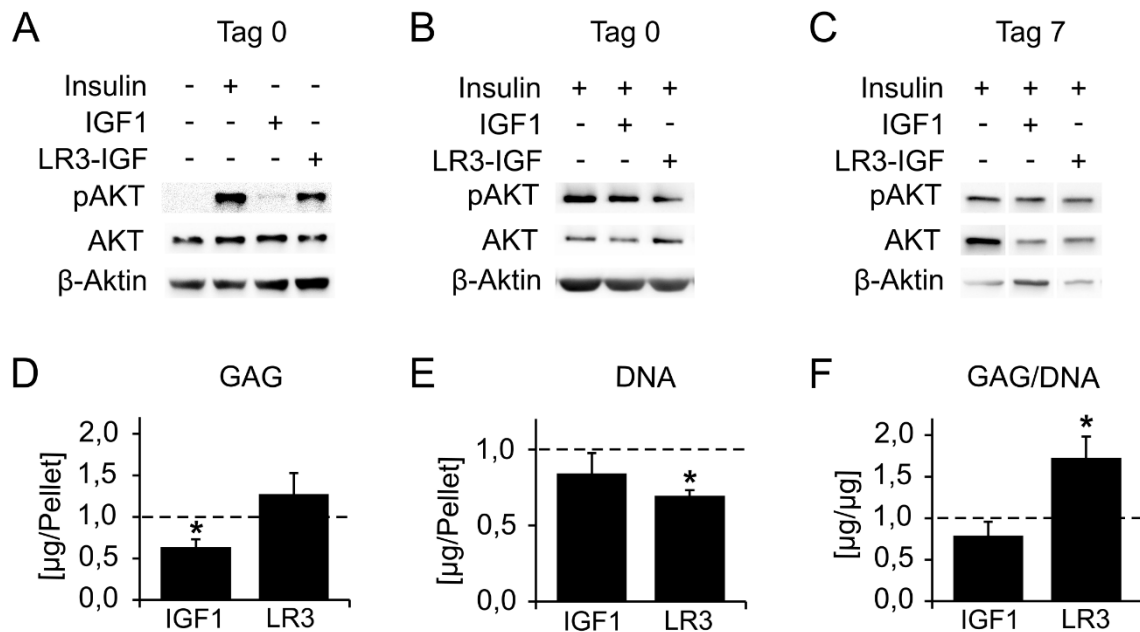


Abbildung 17: Effekte von IGF1 oder LR3-IGF in Ab- oder Anwesenheit von Insulin auf AKT-Aktivierung und Proteoglykan-Ablagerung. (A, B) MSC-Pellets wurden an Tag 0 für 1 Stunde mit 100 ng/ml IGF1 oder 3,5 nM LR3-IGF (LR3) in An- oder Abwesenheit von Insulin behandelt. Die AKT-Aktivierung durch Nachweis von pAKT-Proteinspiegeln wurden mittels Westernblot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle; n = 2. (C) MSC-Pellets wurden bis Tag 7 zusätzlich zur Standardinsulinkonzentration von 6,25 μ g/ml entweder mit 100 ng/ml IGF1 oder 3,5 nM LR3-IGF behandelt. Die pAKT-Proteinspiegel an Tag 7 (48 Stunden nach Mediumwechsel) wurden mittels Westernblot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle; n = 3. (D, E) Der GAG-Gehalt pro Tag-7-Pellet wurde durch DMMB-Assay und der DNA-Gehalt mittels PicoGreen-Assay bestimmt. (F) Normalisierung des GAG-Gehalts von Tag-7-Pellets auf DNA. Die Kontrolle wurde auf 1 gesetzt (unterbrochene Linie). IGF1: n = 3; Kontrolle, LR3: n = 6. Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05, MWU. N-Angaben beziehen sich auf die Experimente mit unabhängigen MSC-Populationen pro Gruppe.

4.5 Verlauf der AKT-Aktivierung während enchondraler MSC-Differenzierung und chondraler AC-Redifferenzierung

4.5.1 Charakterisierung der hypertrophen MSC-Chondrogenese im Vergleich zur AC-Redifferenzierung

Um zunächst die chondrogene Differenzierung von MSC zu bestätigen und die Unterschiede zwischen enchondraler MSC-Chondrogenese und chondraler AC-Redifferenzierung darzulegen, wurden MSC und AC unter identischen Bedingungen mit 10 ng/ml TGF β 1 und 6,25 μ g/ml Insulin als 3D-Pellets kultiviert und der Grad der Differenzierung nach 42 Tagen histologisch, via Genexpressionsanalysen sowie auf Proteinebene mittels Westernblot und Quantifizierung der ALP-Enzymaktivität charakterisiert². Safranin-O- und immunhistochemische Färbungen ergaben für MSC- und AC-Pellets nach 42-tägiger 3D-Kultur eine ähnlich homogene Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagen Typ II (Abbildung 18A, B). Obwohl die COL2A1-mRNA-Spiegel zu Beginn der 3D-Kultur in AC signifikant höher waren, erreichten MSC an Tag 21 und

² Die folgenden Ergebnisse sind teilweise in einer Erstautorpublikation beschrieben worden (Klampfleuther et al. 2022). Entsprechende Hinweise finden sich in den Abbildungsbeschriftungen.

42 vergleichbare *COL2A1*-Level (Abbildung 18C), was eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung in beiden Zelltypen belegte. Im Gegensatz zu AC jedoch war die Expression der hypertrophen Marker *COL10A1* ($p \leq 0,05$), *IHH* und *PTH1R* ($p > 0,05$) in differenzierenden MSC an Tag 21 und 42 erhöht (Abbildung 18D). Damit einhergehend waren auch die mRNA-Spiegel des osteogenen Markers *IBSP* in MSC an Tag 21 und 42 höher als in AC (Abbildung 18E), was sich ebenfalls auf Proteinebene widerspiegelte. Während IBSP-Protein mittels Westernblot-Detektion ab Tag 21 der MSC-Chondrogenese nachweisbar war und im Laufe der weiteren Kultur zunahm, lag der IBSP-Proteinspiegel in den untersuchten AC zu allen

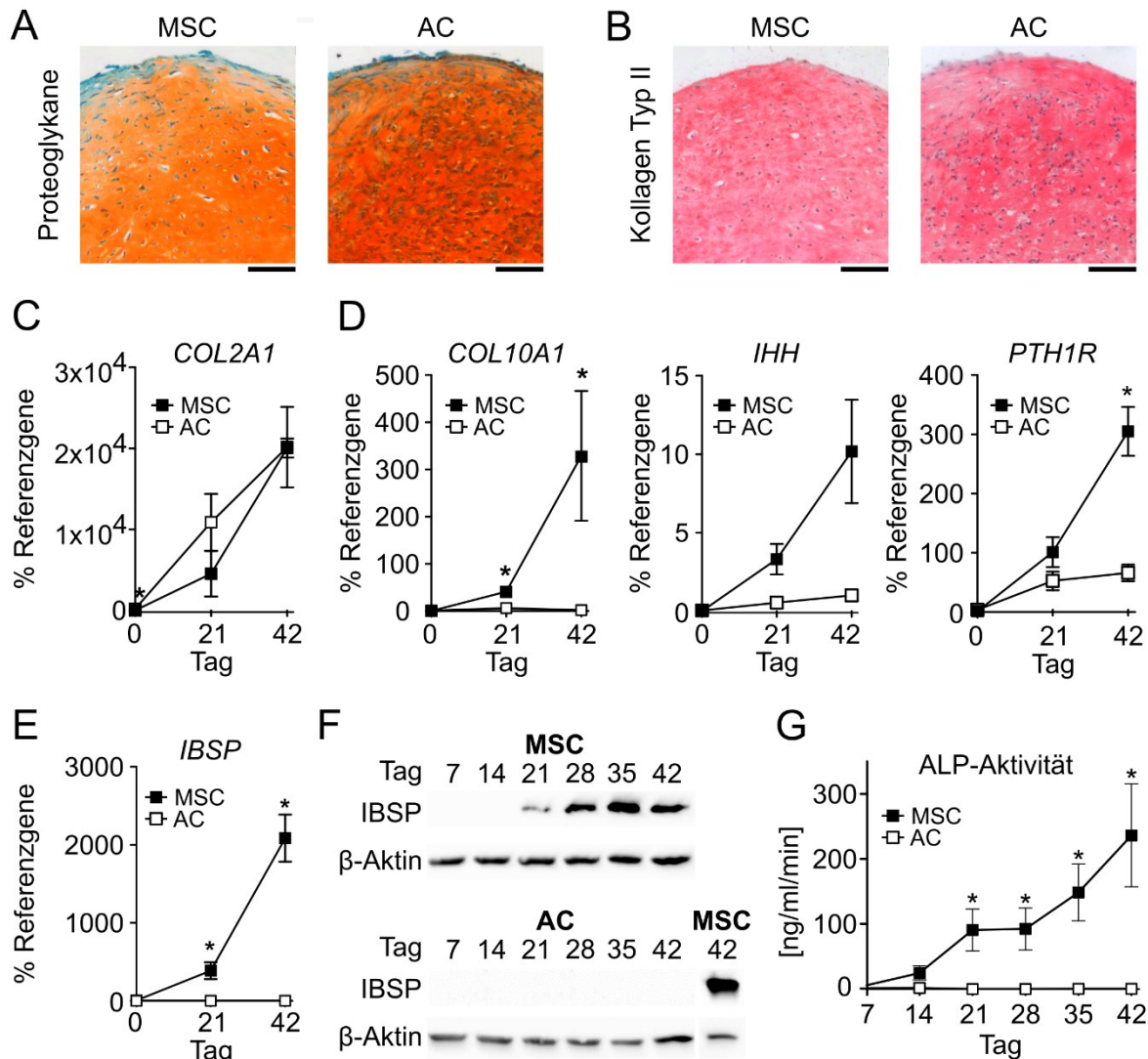


Abbildung 18: Hypertrophe MSC-Chondrogenese versus nicht-hypertrophe AC-Redifferenzierung. (A, B) Safranin-O-Färbung von Proteoglykanen oder Immunhistochemie für Kollagen Typ II von Mikrotomschnitten, die von MSC- oder AC-Pellets nach 42-tägiger 3D-Kultur angefertigt wurden. Maßstabsbalken: 100 μ m. MSC: n = 8; AC: n = 5. **(C, D, E)** Genexpression des chondrogenen Markers *COL2A1*, der hypertrophen Marker *COL10A1*, *IHH* und *PTH1R* sowie des osteogenen Markers *IBSP*. **(F)** IBSP-Proteinspiegel während MSC-Chondrogenese (oben) und AC-Redifferenzierung (unten). Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer von insgesamt drei Westernblots für MSC und AC. β -Aktin diente als Ladekontrolle. **(G)** Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) wurde in vereinten Zellkulturüberständen bestimmt, die für jedes unabhängige Experiment alle 7 Tage von jeweils vier Pellets geerntet wurden. In allen Graphen werden Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * $p \leq 0,05$ MSC versus AC, MWU. MSC: n = 6 - 7, AC: n = 4. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger MSC- oder AC-Populationen. Die Teilabbildungen 18A, B, C, D und G wurden in Klampfleuthner et al. 2022 veröffentlicht.

Zeitpunkten unter der Detektionsgrenze (Abbildung 18F). Auch die ALP-Enzymaktivität im Überstand als weiteres Kennzeichen enchondraler Differenzierung war ab Tag 21 der MSC-Chondrogenese signifikant höher als bei AC, deren Werte auch hier zu jedem Zeitpunkt unter der Nachweisgrenze lagen (Abbildung 18G). Zusammenfassend bewiesen MSC durch Ablagerung einer extrazellulären Knorpelmatrix aus Proteoglykanen und Kollagen Typ II auf AC-ähnlichem Niveau ein hohes chondrogenes Differenzierungspotential. Im Gegensatz zur chondralen AC-Redifferenzierung jedoch folgten MSC dem unerwünschten enchondralen Differenzierungsweg, der durch den Anstieg hypertropher und osteogener Marker gekennzeichnet war.

4.5.2 Vergleich der AKT-Aktivierung während enchondraler MSC-Chondrogenese und chondraler AC-Redifferenzierung

Da bereits zu frühen Zeitpunkten der 3D-Kultur deutliche Unterschiede in der AKT-Aktivierung zwischen MSC-Chondrogenese und AC-Redifferenzierung beobachtet wurden, sollte im Folgenden überprüft werden, ob die AKT-Signalwegaktivität auch in der weiteren enchondralen versus chondralen Differenzierung unterschiedlich verlaufen würde. Hierfür wurden die pAKT-Proteinspiegel in Zelllysaten von MSC- und AC-Pellets bestimmt, die während der 3D-Kultur

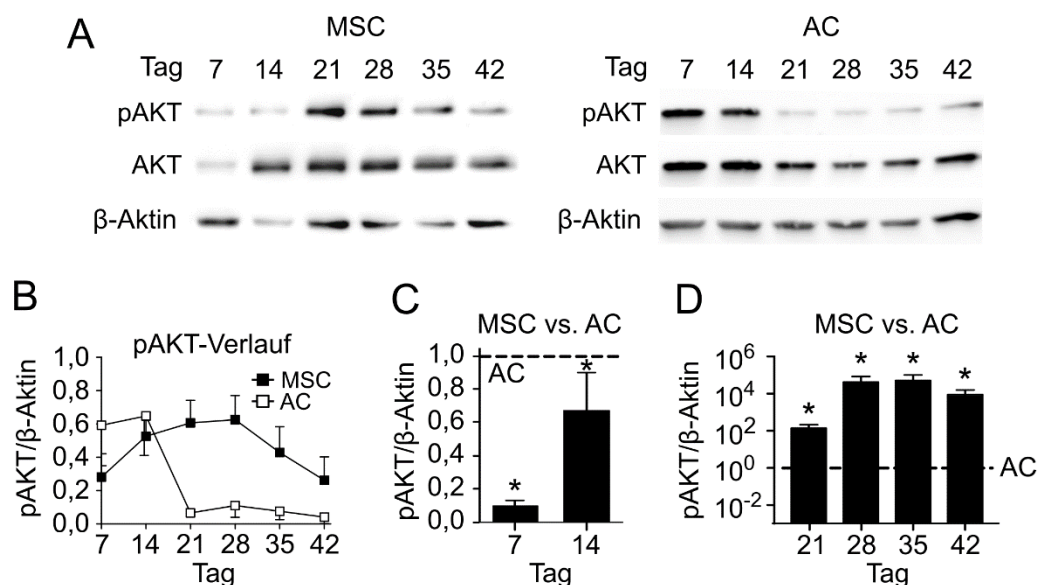


Abbildung 19: Gegenläufige AKT-Aktivierung während MSC-Chondrogenese und AC-Redifferenzierung. (A) Die AKT-Aktivierung im Verlauf der MSC- und AC-3D-Pelletkultur wurde in wöchentlichem Abstand jeweils 48 Stunden nach Mediumwechsel mittels Westernblot-Analyse für pAKT bestimmt. β-Aktin diente als Ladegesteuer. Gezeigt wird jeweils ein repräsentativer von n = 6 - 7 Experimenten mit 6 unabhängigen MSC-Populationen oder n = 4 unabhängigen AC-Populationen. (B) Densitometrische Analyse der pAKT-Proteinspiegel bezogen auf die Bandendichte von β-Aktin im Verlauf von MSC-Chondrogenese und AC-Redifferenzierung. MSC: n = 6 - 7 in 6 unabhängigen Spenderpopulationen. AC: n = 4. (C, D) Densitometrische Analyse vom direkten Vergleich der pAKT-Proteinspiegel zwischen MSC und AC zu den genannten Zeitpunkten. Proben von Tag 7 und 14, sowie Proben von Tag 21 bis 42 wurden jeweils auf derselben Membran miteinander verglichen. Mittelwerte ± SEM; MSC, AC: n = 3. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger Spenderpopulationen von MSC und AC. * p ≤ 0,05 MSC versus AC, MWU. Die Teilabbildungen 19A, B und D wurden in Klampfleuthner et al. 2022 veröffentlicht.

in wöchentlichen Abständen jeweils 48 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel geerntet worden waren, und der Verlauf der AKT-Aktivierung in MSC und AC miteinander verglichen. Interessanterweise stiegen die pAKT-Proteinspiegel in allen fünf untersuchten MSC-Populationen innerhalb der ersten drei Wochen der Chondrogenese an und erreichten einen populationsabhängigen Höhepunkt zwischen Tag 7 und 28 (Abbildung 19A, B). In vier von fünf MSC-Populationen nahm die AKT-Aktivierung anschließend bis Tag 42 sukzessive ab. Im Gegensatz zur MSC-Chondrogenese sanken die pAKT-Proteinspiegel während der AC-Redifferenzierung bis Tag 21 und blieben bis zum Ende der 3D-Kultur auf niedrigem Niveau (Abbildung 19A, B). Der direkte Vergleich der pAKT-Proteinspiegel auf derselben Westernblot-Membran ergab signifikant niedrigere pAKT-Proteinspiegel in MSC versus AC an Tag 7 und Tag 14 (Abbildung 19C), aber ein signifikant höheres pAKT-Niveau in MSC verglichen zu AC zwischen Tag 21 und 42 (Abbildung 19D). Auffällig war somit, dass sich die AKT-Aktivierung in der frühen (Tag 0 - 14) und späten 3D-Kultur (Tag 21 - 42) in MSC und AC gegenläufig verhielt, was einen wichtigen Unterschied bezüglich des AKT-Signalwegs zwischen enchondraler MSC-Differenzierung und chondraler AC-Redifferenzierung darstellte.

4.5.3 Abhängigkeit der AKT-Aktivierung von TGF β 1, BMP-, FGFR- und WNT-Signaling

Der PI3K/AKT-Signalweg ist ein zentraler Knotenpunkt im zellulären Signalnetzwerk, der von vielen anderen Signalwegen beeinflusst werden kann. Der transiente Anstieg der AKT-Aktivierung unter konstanten Kulturbedingungen warf somit die Frage auf, ob typische Chondrogenese-relevante Signalwege für diese Erhöhung der pAKT-Spiegel verantwortlich sein könnten. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die AKT-Aktivierung von TGF β 1, BMP und FGFR, die die Geschwindigkeit der chondrogenen Differenzierung regulieren, oder von pro-hypertrophem WNT kontrolliert wird, was erste Hinweise auf die AKT-Funktion während der MSC-Chondrogenese liefern könnte.

4.5.3.1 Effekt von TGF β 1 auf AKT-Aktivierung

In verschiedenen Zelltypen wie humanen AC, Chondrozyten-Vorläufern aus der Maus oder in humanen Krebszelllinien führte TGF β -Behandlung zu AKT-Phosphorylierung (Cheng et al. 2014; Qureshi et al. 2007; Walker et al. 2013). In den oben beschriebenen Versuchen führte TGF β 1-Behandlung von chondrogen induzierten MSC an Tag 1 in manchen Versuchen zu einer leichten Reduktion der AKT-Phosphorylierung. Um den Beitrag von TGF β 1 zur AKT-Aktivierung während der MSC-Chondrogenese zu untersuchen, wurde die TGF β 1-Behandlung ab Tag 21, in der Phase höchster AKT-Aktivierung, abgebrochen (kein TGF β 1), während die Kontrollpellets für die gesamte 6-wöchige Kulturdauer mit 10 ng/ml TGF β 1 behandelt wurden (Ktrl). Safranin-O- und immunhistochemische Färbungen von Tag-42-Kontrollpellets

zeigten eine durchweg homogene, starke Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagen Typ II, während die Pellets der Behandlungsgruppe vor allem in den Randbereichen deutlich schwächer gefärbt waren (Abbildung 20A, B). Interessanterweise waren die pAKT-Proteinspiegel unter TGF β 1-Entzug in vier von fünf MSC-Populationen an Tag 35 und 42 höher als in der Kontrolle (Abbildung 20C, D). Auch wenn in einem von fünf Experimenten die pAKT-Level unter TGF β 1-Entzug reduziert waren, wiesen diese Ergebnisse in Summe darauf hin, dass TGF β 1 während der späten MSC-Chondrogenese ein AKT-Antagonist zu sein schien. Da TGF β 1 die pAKT-Spiegel zu Beginn der Knorpelneogenese spenderabhängig nicht oder nur leicht reduzierte, schien die AKT-Inhibition durch TGF β 1 mit fortschreitender Differenzierung zuzunehmen.

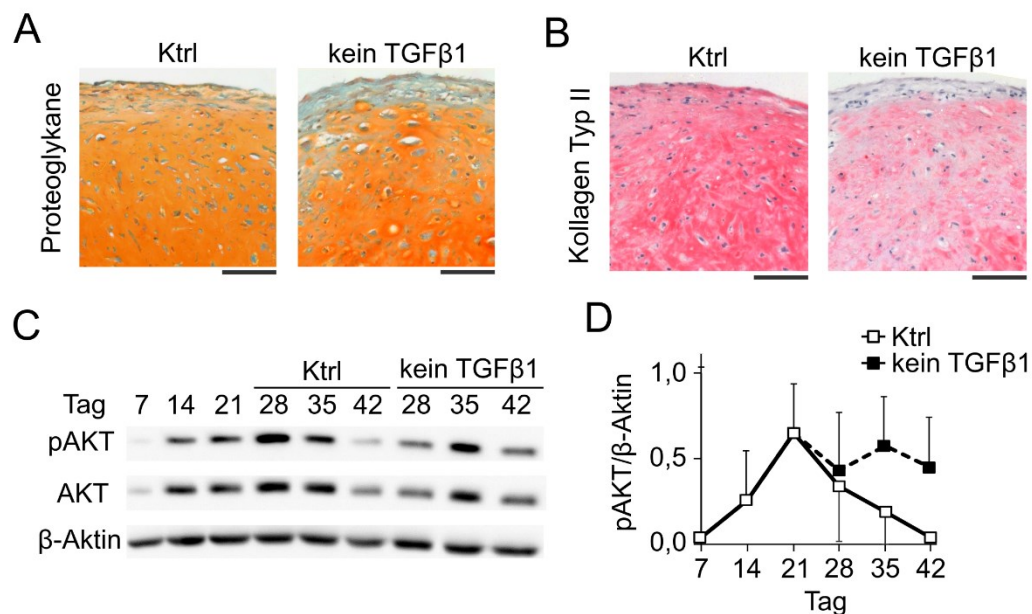


Abbildung 20: Abhängigkeit der AKT-Aktivierung von TGF β -Behandlung während der MSC-Chondrogenese. MSC-Pellets wurden für 6 Wochen als 3D-Pellets unter chondrogenen Bedingungen kultiviert. Ab Tag 21 wurde dem chondrogenen Medium der Behandlungsgruppe TGF β nicht weiter zugesetzt (kein TGF β), während die Kontrollpellets über den gesamten Kulturzeitraum mit 10 ng/ml TGF β behandelt wurden. **(A, B)** Mikrotomschnitte von MSC-Pellets geerntet an Tag 42 nach Safranin-O-Färbung von Proteoglykanen und Immunhistochemie für Kollagen Typ II. Maßstabsbalken: 100 μ m. **(C)** Proteinspiegel von pAKT und AKT wurden mittels Westernblot analysiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt wird ein repräsentatives von insgesamt drei Experimenten. **(D)** Densitometrische Analyse der pAKT-Proteinspiegel bezogen auf die Bandendichte von β -Aktin in Abhängigkeit von TGF β 1 im Verlauf der MSC-Chondrogenese. Mediane \pm 95% Konfidenzintervalle; n = 3 unabhängige MSC-Populationen. Veröffentlicht in Klampfleuthner et al. 2022.

4.5.3.2 Effekt von BMP-Signalwegaktivität auf AKT-Aktivierung

Mit BMP wurde im nächsten Schritt ein Signalweg untersucht, der während der MSC-Chondrogenese endogen induziert wird und auch als AKT-Induktor in verschiedenen Zelltypen bekannt ist (Chattopadhyay et al. 2017; Chen et al. 2014; Lee et al. 2009b). Um die BMP-Signalwegaktivität zu reduzieren wurde LDN-212854 (LDN-21) verwendet, das als selektiver Inhibitor neben der Aktivin-Rezeptor-ähnlichen Kinase-1 (*engl.* activin receptor-like kinase-1, ALK1;

auch: activin A receptor like 1, ACVRL1) auch ALK2, 3 und 6 und somit alle typischen BMP-responsiven Typ-I-Rezeptoren inhibiert. Die Aktivität des Inhibitors wurde in Tag-0-MSC-Pellets untersucht, die nach 2-stündiger Vorbehandlung mit 500 nM LDN-21 oder 0,02% DMSO (Kontrolle) für eine Stunde mit jeweils 10 ng/ml oder 100 ng/ml BMP4 und BMP7 stimuliert wurden. Die BMP-induzierten pSMAD1/5/9-Proteinspiegel wurden durch LDN-21 deutlich reduziert, was die Inhibition der BMP-Signalwegaktivität unter LDN-21 belegte (Abbildung 21A). Dies wurde durch die Reduktion der ALP-Enzymaktivität nach 6-wöchiger LDN-21-Behandlung untermauert (Abbildung 21B), die gemäß der beschriebenen geringen Bedeutung von BMP/ALK1/2/3/6-Signaling während der MSC-Chondrogenese (Diederichs, Dreher, Nüesch et al., Publikation in Vorbereitung) relativ gering war. Laut Evaluierung histologischer

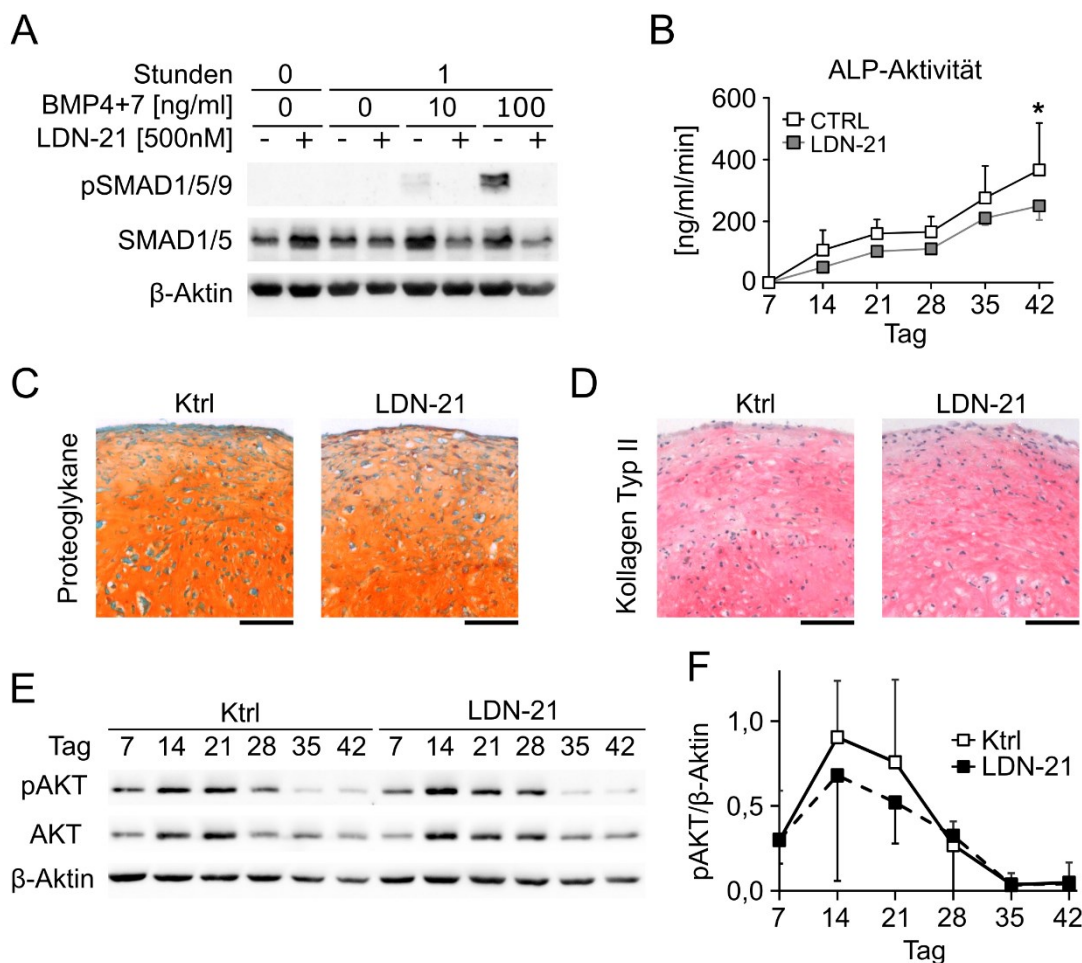


Abbildung 21: Abhängigkeit der AKT-Aktivierung vom BMP-Signalweg während enchondraler MSC-Differenzierung. (A) MSC-Pellets wurden an Tag 0 der Chondrogenese für 2 Stunden mit 0,02% DMSO (Ktrl) oder 500 nM LDN-212854 (LDN-21) vorbehandelt und anschließend mit je 10 oder 100 ng/ml der angegebenen BMP-Liganden stimuliert. Proteinspiegel von pAKT und AKT wurden mittels Westernblot analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle; n = 1. (B) Die ALP-Enzymaktivität in Abhängigkeit von LDN-21 wurde in wöchentlichen Abständen während 42-tägiger MSC-Chondrogenese in vereinten Zellkulturüberständen von vier Pellets bestimmt; n = 3. Mittelwerte ± SEM; * p < 0,05. (C, D) Mikrotomschnitte von Tag-42-MSC-Pellets nach Safranin-O-Färbung von Proteoglykanen und Immunhistochemie für Kollagen Typ II; n = 3. Maßstabsbalken: 100 µm. (E) Westernblot: Proteinspiegel von pAKT und AKT in Abhängigkeit von LDN-21-Behandlung. Gezeigt wird ein repräsentatives von insgesamt drei Experimenten; n = 3. (F) Densitometrische Analyse der pAKT-Proteinspiegel bezogen auf die Bandendichte von β-Aktin in Abhängigkeit von LDN-21. Mediane ± 95% Konfidenzintervalle; n = 3. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger MSC-Populationen. Veröffentlicht in Klampfleuthner et al. 2022.

Färbungen war die Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagen Typ II in Tag-42-Pellets von Kontroll- und LDN-21-Gruppe vergleichbar (Abbildung 21C, D). Darüber hinaus blieben auch die pAKT-Proteinspiegel unter BMP-Inhibition an allen untersuchten Zeitpunkten unverändert (Abbildung 21E, F), womit auch der BMP-Signalweg nicht verantwortlich für die steigende AKT-Aktivität während der MSC-Chondrogenese zu sein schien.

4.5.3.3 Effekt von FGFR-Signalwegaktivität auf AKT-Aktivierung

Auf der weiteren Suche nach einem Chondrogenese-relevanten, AKT-induzierenden Signalweg wurde im Folgenden der FGFR-Signalweg näher beleuchtet. Als starker ERK- sowie AKT-Induktor in vielen Zellsystemen beschrieben (Quan et al. 2020; Turner und Grose 2010), reguliert der FGFR-Signalweg die Geschwindigkeit der chondrogenen MSC-Differenzierung *in vitro* (Dreher et al. 2020). Um eine möglichst weitreichende Inhibition des FGF-Signalweges zu erreichen, wurde mit PD173074 (PD) ein ATP-kompetitiver Inhibitor gewählt, der die Aktivität von allen vier FGFRs reduziert. Für die Analyse der pAKT-Proteinspiegel unter FGFR-Inhibition ab Tag 7 wurde auf bereits bestehende Proteinlysate zurückgegriffen, die im Kontext des Einflusses von FGF auf die MSC-Chondrogenese hergestellt wurden (Dreher et al. 2020). Unter PD-Behandlung war die AKT-Aktivierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in allen drei unabhängigen Experimenten vor allem an Tag 21, dem Zeitpunkt maximaler pAKT-Spiegel bezogen auf β -Aktin, reduziert (Abbildung 22A - D). Interessanterweise schien die Klimax der AKT-Aktivierung unter PD früher aufzutreten als unter Kontrollbedingungen, was vor allem in

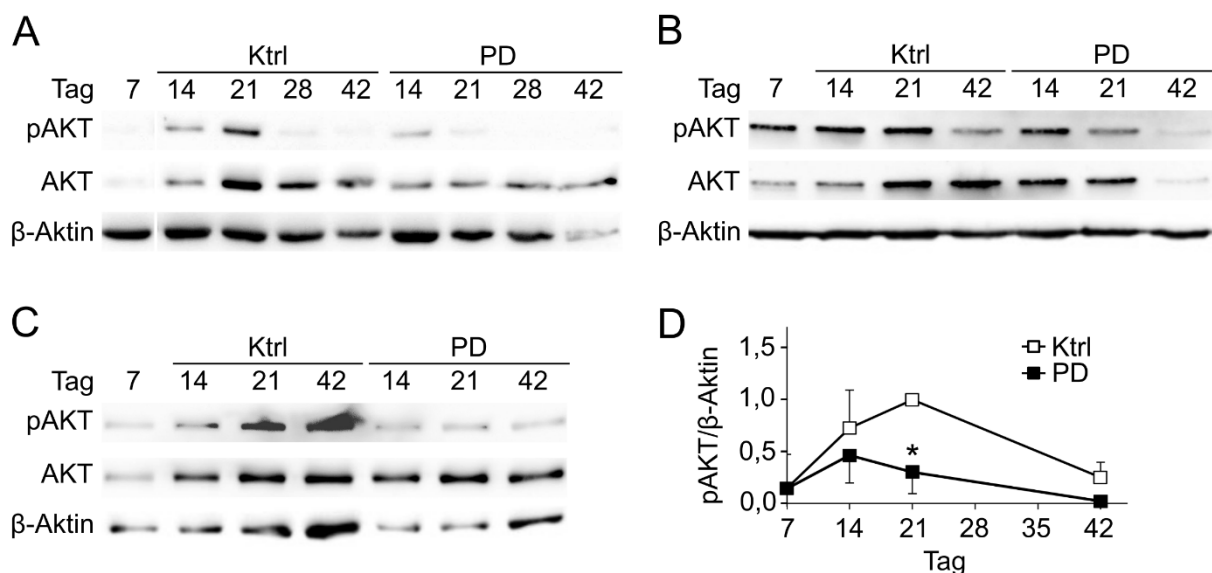


Abbildung 22: Abhängigkeit der AKT-Aktivierung vom FGFR-Signalweg. MSC-Pellets unter chondrogenen Bedingungen wurden ab Tag 7 der 3D-Kultur mit 250 nM PD173074 (PD) oder der entsprechenden Konzentration des Lösungsmittels DMSO (0,02%; Ktrl) behandelt. **(A, B, C)** Die Proteinspiegel von pAKT und AKT in Abhängigkeit von PD-Behandlung wurden mittels Westernblot in drei unabhängigen MSC-Population bestimmt; n = 3. **(D)** Densitometrische Analyse der pAKT-Proteinspiegel bezogen auf die Bandendichte von β -Aktin in Abhängigkeit von PD; n = 3. Mediane \pm 95% Konfidenzintervalle; * p < 0,05, MWU. Zellkulturarbeiten, Herstellung der Proteinlysate und die Durchführung der in B und C gezeigten Westernblots erfolgte durch Simon Dreher.

zwei von drei Experimenten evident war (Abbildung 22A, B). Anhand dieser Experimente wurde der FGFR-Signalweg als ein Verstärker der AKT-Phosphorylierung während der MSC-Chondrogenese identifiziert, der den Verlauf der AKT-Aktivierung leicht zu verzögern schien.

4.5.3.4 Effekt von WNT-Signalwegaktivität auf AKT-Aktivierung

Als ein wesentlicher Treiber der hypertrophen MSC-Differenzierung gilt der WNT-Signalweg (Diederichs et al. 2019). Sollte AKT unter Kontrolle des WNT-Signalweges stehen, wäre eine Verringerung der AKT-Aktivität unter WNT-Inhibition zu erwarten. Um dies zu überprüfen, wurde WNT-Aktivität einem bereits etablierten Protokoll entsprechend mittels 2 μ M IWP-2 ab Tag 14 der Chondrogenese inhibiert (Diederichs et al. 2019; Narcisi et al. 2015) und die daraus resultierenden Effekte auf die pAKT-Proteinspiegel untersucht. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Diederichs et al. 2019) schienen Proteoglykan- und Kollagen-Typ-II-Ablagerung unter IWP-2 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle leicht erhöht (Abbildung 23A, B), während die ALP-Aktivität unter IWP-2 signifikant reduziert wurde (Abbildung 23C). Wie zuvor beobachtet, verlief auch in diesen Experimenten der AKT-Anstieg mit typischer Klimax bis Tag 21 und abschließendem Abfall, worauf die Behandlung mit IWP-2 keinerlei Einfluss nahm (Abbildung 23D, E). Somit war auch WNT-Aktivität während der MSC-Chondrogenese nicht für die erhöhten pAKT-Proteinspiegel verantwortlich.

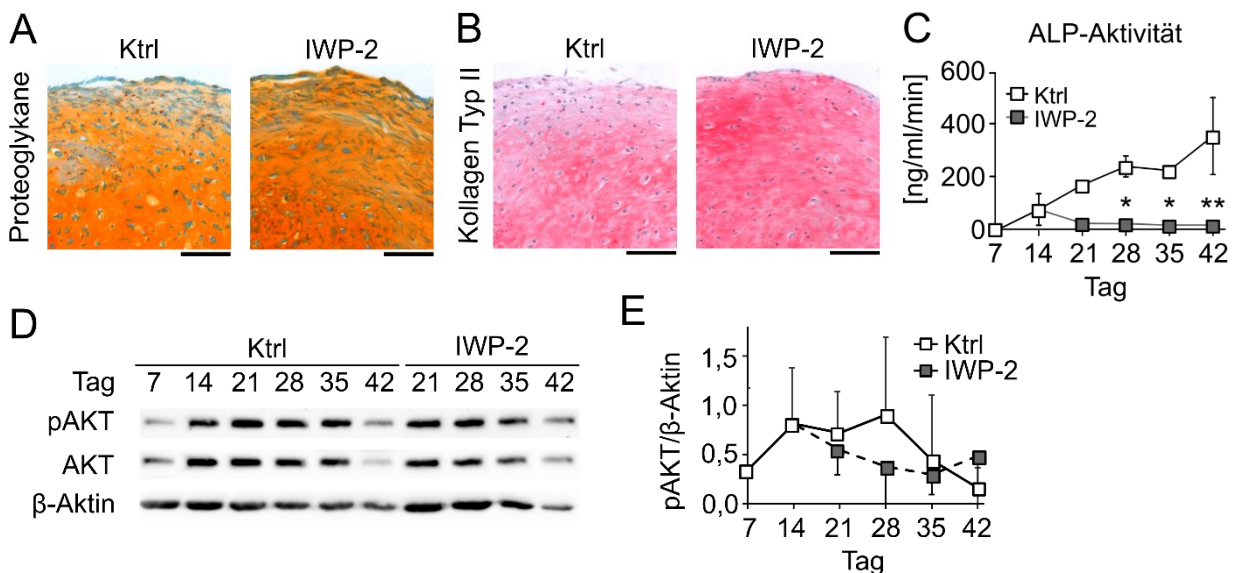


Abbildung 23: Abhängigkeit der AKT-Aktivierung vom WNT-Signalweg. MSC-Pellets unter chondrogenen Bedingungen wurden ab Tag 14 der 3D-Kultur mit 2 μ M IWP-2 oder 0,04% DMSO (Ktrl) behandelt. **(A, B)** Safranin-O-Färbung von Proteoglykanen oder Immunhistochemie für Kollagen Typ II von Tag 42-MSC-Pellets; n = 3. Maßstabsbalken: 100 μ m. **(C)** Die ALP-Enzymaktivität in Abhängigkeit von IWP-2 wurde in wöchentlichen Abständen während 6-wöchiger MSC-Chondrogenese in vereinten Zellkulturüberständen von vier Pellets bestimmt; n = 3. Mittelwerte \pm SEM; * p < 0,05, * p < 0,01, MWU. **(D)** Westernblot-Detektion von pAKT- und AKT-Proteinspiegeln in Abhängigkeit von IWP-2. Gezeigt wird ein repräsentatives von insgesamt drei Experimenten; n = 3. **(E)** Densitometrische Analyse der pAKT-Proteinspiegel bezogen auf die Bandendichte von β -Aktin in Abhängigkeit von IWP-2. Mediane \pm 95% Konfidenzintervalle; n = 3. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger MSC-Populationen. Veröffentlicht in Klampfleuthner et al. 2022.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse dar, dass im Gegensatz zu TGF β , BMP oder WNT die globale FGFR-Aktivität einen Beitrag zur steigenden AKT-Aktivierung während der MSC-Chondrogenese leistete. Da FGFR-Signaling die Geschwindigkeit der MSC-Chondrogenese reguliert, ohne spezifisch die hypertrophe Differenzierung zu beeinflussen, könnte dies möglicherweise darauf hinweisen, dass AKT in die Kontrolle der chondrogenen Differenzierungsgeschwindigkeit involviert ist. Durch Inhibition der AKT-Aktivität während der MSC-Chondrogenese sollte diese Hypothese im Folgenden validiert werden.

4.6 Die funktionale Klassifizierung des AKT-Signalweges für die MSC-Chondrogenese

Um die funktionale Rolle von AKT für die enchondrale MSC-Differenzierung zu bestimmen wurde die AKT-Aktivität im Folgenden ab Tag 21 der MSC-Chondrogenese durch den gängigen PI3K-Inhibitor LY294002 (LY) reduziert, dessen inhibitorische Aktivität durch Besetzen der ATP-Bindeposition entsteht (Vlahos et al. 1994; Walker et al. 2000).

4.6.1 Nachweis reduzierter AKT-Aktivierung durch den PI3K-Inhibitor LY294002

Um zunächst nachzuweisen, dass die LY-vermittelte PI3K-Inhibition tatsächlich zu reduzierten pAKT-Proteinspiegeln in chondrogen induzierten MSC führt, wurden MSC-Pellets unmittelbar bei Induktion der chondrogenen Differenzierung für 0,5 Stunden mit insulin-haltigem chondrogenem Medium behandelt, das entweder die entsprechende Menge des für LY verwendeten Lösungsmittels DMSO (0,1%; Kontrolle) oder 25 μ M LY enthielt. Die Insulin-induzierten pAKT-Proteinspiegel nach 30-minütiger Stimulation wurden durch 25 μ M LY deutlich reduziert (Abbildung 24), was den verwendeten PI3K-Inhibitor als valides Instrument bestätigte, um die AKT-Aktivierung in MSC zu verringern.

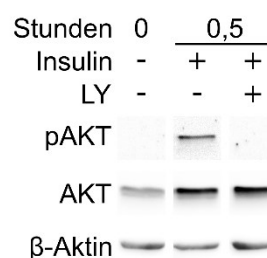


Abbildung 24: Effekt des PI3K-Inhibitors LY294002 auf AKT-Phosphorylierung. MSC-Pellets an Tag 0 wurden für 0,5 Stunden mit chondrogenem Medium behandelt, das neben Insulin 0,1% DMSO (Kontrolle) oder 25 μ M LY294002 (LY) enthielt. Die Proteinspiegel von pAKT und AKT wurden mittels Westernblot bestimmt. β -Aktin diente als Ladekontrolle; n = 1.

4.6.2 Einfluss von 25 μM LY294002 auf die enchondrale MSC-Differenzierung

Um herauszufinden, ob AKT für die enchondrale MSC-Differenzierung eine pro-hypertrophe oder pro-chondrogene Rolle spielte, wurde die PI3K/AKT-Aktivität durch Behandlung mit 25 μM LY ab Tag 21 inhibiert, da die AKT-Aktivierung zu diesem Zeitpunkt der MSC-Chondrogenese im Mittel am stärksten ausfiel (siehe Abbildung 19A). Die Westernblot-Analyse bestätigte eine deutliche Reduktion der pAKT-Proteinspiegel durch 25 μM LY an allen untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 25A, B). Beachtenswert war die stark reduzierte Expression der hypertrophen Marker *COL10A1* (- 81%, $p > 0,05$), *IHH* (- 95%, $p \leq 0,05$), *PTH1R* (- 76%, $p \leq 0,05$) unter LY-Behandlung an Tag 42 (Abbildung 25C), die für *IHH* und *PTH1R* sogar unter das Niveau von Tag 21 zu fallen schien. Unter den osteogenen Markern war unter LY-Behandlung neben der ALP-Enzymaktivität (Abbildung 25D) auch *IBSP*-mRNA (- 94%, $p \leq 0,05$) und IBSP-Protein an Tag 42 reduziert (Abbildung 25E, F).

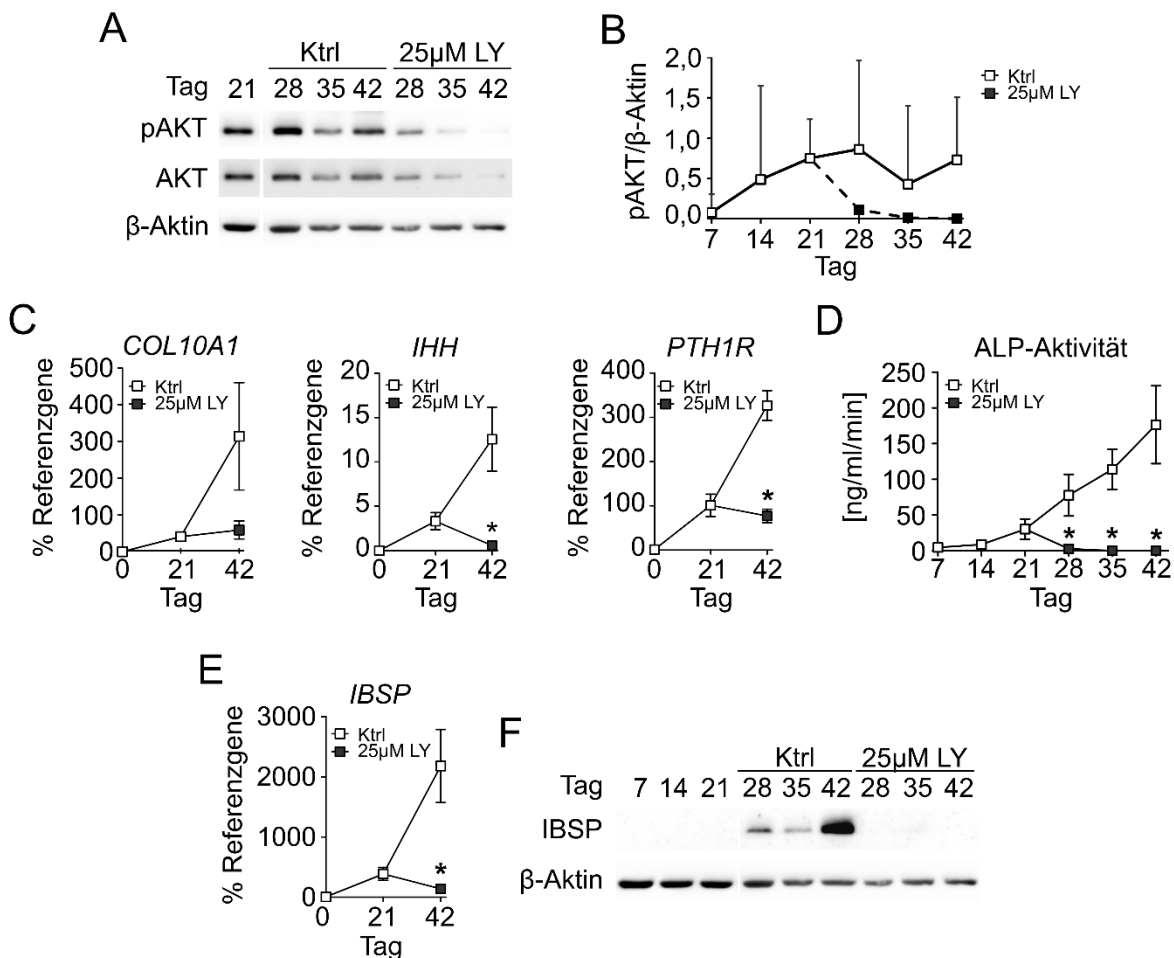


Abbildung 25: Effekt von 25 μM LY auf die hypertrophe Differenzierung während der MSC-Chondrogenese. MSC-Pellets wurden ab Tag 21 mit 0,1% DMSO (Ktrl) oder 25 μM LY behandelt und Effekte auf Hypertrophie in MSC-basierten Chondrozyten untersucht. **(A)** pAKT- und AKT-Proteinspiegel wurden mittels Westernblot bestimmt. β -Aktin diente als Ladekontrolle; $n = 3$. **(B)** Densitometrie für Westernblots aus (A). Mediane \pm 95% Konfidenzintervalle. **(C, E)** Genexpression der hypertrophen Marker *COL10A1*, *IHH* und *PTH1R* und des osteogenen Markers *IBSP* mit *CPSF6* und *RPL13* als Referenzgene an Tag 42; $n = 3$. **(D)** Die ALP-Enzymaktivität wurde in wöchentlichen Abständen in kombinierten Zellkulturüberständen von vier bis fünf Pellets bestimmt. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, MWU; $n = 3$. **(F)** Westernblot-Detektion von IBSP; $n = 3$. * $p < 0,05$, Ktrl vs. 25 μM LY, MWU. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger MSC-Populationen. Die Teilabildungen 25A, B, C und D wurden in Klampfleuthner et al. 2022 veröffentlicht.

Neben dieser deutlichen Abnahme von hypertrophen und osteogenen Markern wurde jedoch auch die Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagen Typ II durch die Behandlung mit 25 μM LY stark beeinträchtigt (Abbildung 26A, B). Die Quantifizierung des GAG/DNA-Verhältnisses ergab eine signifikante Verringerung von 70% in der LY-Gruppe verglichen zur Kontrolle (Abbildung 26C). Die augenscheinlich reduzierte Größe der LY-behandelten Pellets (Übersichtsbilder in Abbildung 26A, B) spiegelte sich in einem signifikant reduzierten DNA-Gehalt wider (- 38%, $p \leq 0,05$, Abbildung 26D). Darüber hinaus war auch die Expression der chondrogenen Marker *COL2A1* und *ACAN* um jeweils 98% reduziert ($p \leq 0,05$), was die starke Beeinträchtigung der MSC-Chondrogenese LY durch dreiwöchige Behandlung mit 25 μM LY unterstrich. Dies verdeutlichte, dass die AKT-Signalwegaktivität in der späten MSC-Chondrogenese notwendig war, um eine effiziente Ablagerung von Knorpelmatrix zu gewährleisten.

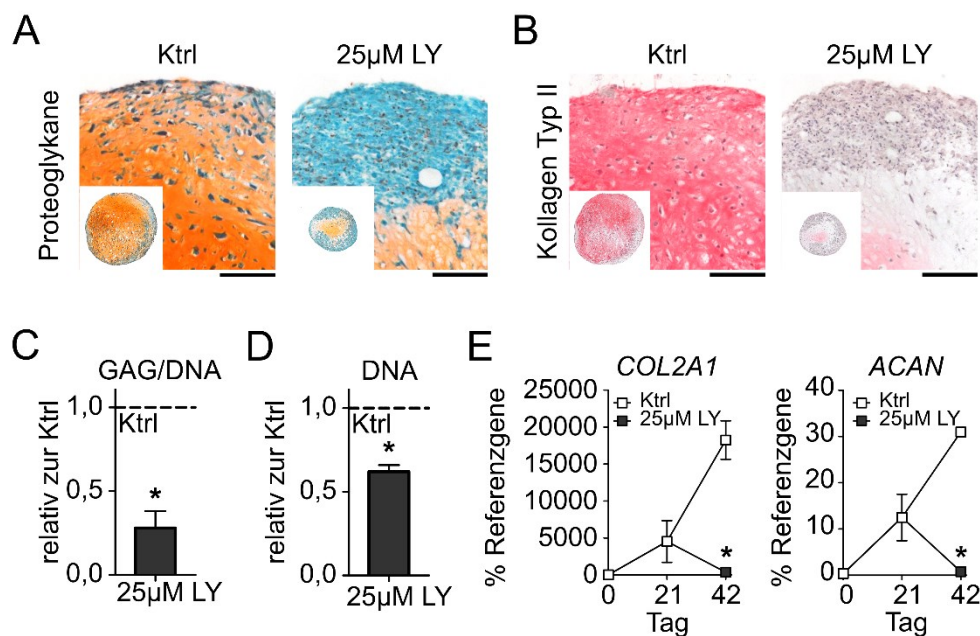


Abbildung 26: Effekt reduzierter AKT-Aktivierung durch 25 μM LY auf die chondrogene Differenzierung in MSC. MSC-Pellets wurden ab Tag 21 mit 0,1% DMSO (Ktrl) oder 25 μM LY behandelt und Effekte auf die MSC-Chondrogenese untersucht. (A, B) Mikrotomschnitte von Tag-42-MSC-Pellets nach Safranin-O-Färbung von Proteoglykanen und Immunhistochemie für Kollagen Typ II. Maßstabsbalken: 100 μm für Vergrößerungen und 1 mm für Übersichtsbilder; $n = 3$. (C, D) GAG/DNA-Verhältnis: der GAG-Gehalt pro Pellet wurde mittels DMMB-Assay, der DNA-Gehalt mittels PicoGreen-Assay bestimmt. (E) Tag-42-Genexpression der chondrogenen Marker *COL2A1* und *ACAN* mit *CPSF6* und *RPL13* als Referenzgenen; $n = 3$. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$, MWU. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger MSC-Populationen. Veröffentlicht in Klampfleuthner et al. 2022.

4.6.3 Regulation der PTHLH-Expression durch AKT-Aktivität

Der beobachtete Einbruch der MSC-Chondrogenese durch 25 μM LY war vergleichbar mit Ergebnissen einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe, in der konstante Behandlung mit 2,5 nM PTHrP(1-34) zu deutlich kleineren Pellets mit stark beeinträchtigter Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagen Typ II führte (Fischer et al. 2014). In einer *In-vivo*-Mausstudie

wurde von erhöhten mRNA- und Proteinspiegeln von *Pthrp* unter knorpelspezifischem *Igf1r*-Knockout berichtet (Wang et al. 2011). Dies deutete an, dass der *Igf1r*-/*Akt*-Signalweg in der Wachstumsfuge in die Expression von *Pthrp* und somit *Ihh* involviert sein könnte. In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, dass redifferenzierende AC ab Tag 21 der 3D-Kultur hohe PTHrP-Level sekretierten, während die PTHrP-Sekretion in MSC ab Tag 14 stark abnahm und bis Tag 28 vollständig zum Erliegen kam (Fischer et al. 2010). Im Kontext der anti-hypertrophen PTHrP-Funktion in der Wachstumsfuge höchst interessant erscheint der inverse Verlauf von PTHrP-Sekretion und AKT-Aktivierung während MSC-Chondrogenese und AC-Redifferenzierung. Aus dem Vergleich von PTHrP- und AKT-Verlauf und den Hinweisen aus der Literatur leitete sich die Fragestellung ab, ob die steigende AKT-Aktivität in MSC für den Abfall der PTHrP-Spiegel verantwortlich sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde die AKT-Aktivierung in MSC-Pellets zweier unabhängiger MSC-Populationen ab

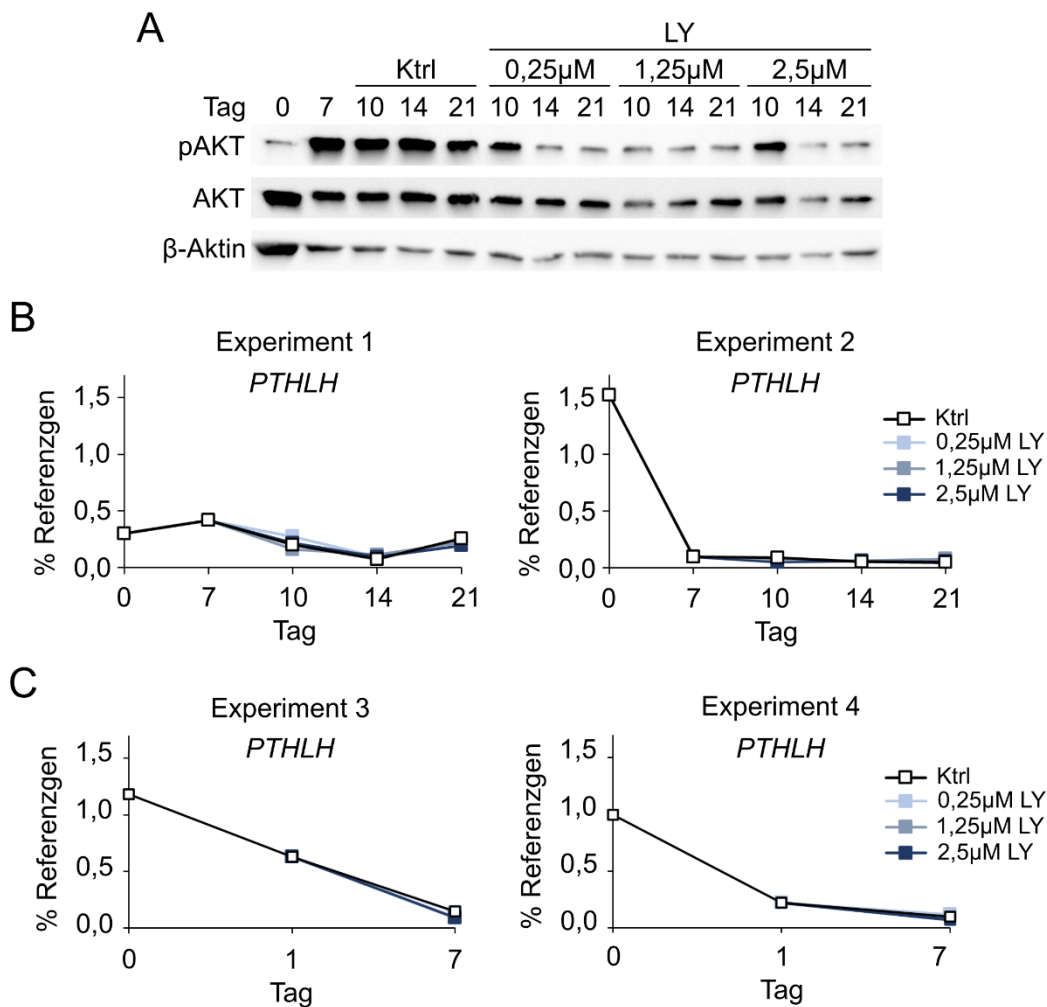


Abbildung 27: Effekt von reduzierter AKT-Aktivierung auf die PTHLH-Expression. MSC-Pellets wurden ab Tag 7 (A, B) oder Tag 1 (C) mit 0,01% DMSO (Ktrl) oder 0,25 - 2,5 μM LY behandelt. **(A)** Proteinspiegel von pAKT und AKT wurden mittels Westernblot bestimmt. β-Aktin diente als Ladekontrolle; n = 1. **(B, C)** Die PTHLH-Genexpression unter LY-Behandlung in insgesamt vier unabhängigen Experimenten wurde auf das Referenzgen *RPL13* bezogen; n = 2 für LY ab Tag 7 bzw. Tag 1. A und Experiment 2 zeigen Daten derselben MSC-Population. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger Spenderpopulationen.

Tag 7 durch LY inhibiert und der Verlauf der *PTH1H*-mRNA-Spiegel mittels qPCR analysiert. Da in vorherigen Experimenten Behandlung mit 25 μM LY ab Tag 21 die Aufrechterhaltung des Chondrozytenphänotyps stark beeinträchtigte, wurden für die folgende Versuchsreihe niedrigere Inhibitorkonzentrationen von 0,25 μM , 1,25 μM und 2,5 μM LY gewählt, um die Frage nach der Beteiligung von AKT zur *PTH1H*-Expression beantworten zu können. Bereits eine Konzentration von 0,25 μM LY war ausreichend, um die pAKT-Proteinspiegel im Vergleich zur Kontrolle zu verringern ($n = 1$; Abbildung 27A). In Experiment 1 blieb die *PTH1H*-Expression ab Tag 0 auf einem niedrigen Niveau und wurde im weiteren Kulturverlauf durch keine der verwendeten LY-Konzentrationen beeinflusst (Abbildung 27B, links). Im zweiten unabhängigen Experiment wurden hohe *PTH1H*-Spiegel an Tag 0 bis Tag 7 stark reduziert, wobei LY-Behandlung keinen Einfluss auf die *PTH1H*-Expression hatte (Abbildung 27B, rechts). Da dieser starke Abfall der *PTH1H*-Spiegel (- 94%) in diesem Versuch bereits nach Tag 0 und somit vor LY-Behandlung auftrat, hätte diese zeitliche Abfolge potentielle LY-Effekte auf *PTH1H* möglicherweise maskieren können. Um dies in den folgenden Experimenten zu vermeiden, wurden MSC-Pellets bereits ab Tag 1 mit LY behandelt. Auch in den Experimenten 3 und 4 sank die *PTH1H*-Expression bereits nach Tag 0 um 47% bzw. 78% und unabhängig von LY-Behandlung weiter bis Tag 7 (Abbildung 27D). Somit war AKT-Aktivierung, anders als für Chondrozyten in der Wachstumsfuge vorgeschlagen, nicht für den Abfall der *PTH1H*-Expression während der MSC-Chondrogenese verantwortlich.

4.6.4 Effekte von 0,25 μM , 1,25 μM oder 2,5 μM LY294002 auf hypertrophe und osteogene Marker

Um auszuschließen, dass eine zu starke, anti-chondrogene PI3K/AKT-Inhibition mögliche prohypertrophe AKT-Effekte maskierte, war es notwendig, AKT zu inhibieren, ohne die MSC-Chondrogenese erheblich zu beeinträchtigen. Deswegen wurden MSC-Pellets im Folgenden ab Tag 21 mit den im Vergleich zur ursprünglich gewählten Dosis von 25 μM niedrigeren LY-Konzentrationen 0,25 μM , 1,25 μM oder 2,5 μM behandelt.

Wie zuvor bereits beobachtet reduzierten alle drei Inhibitorkonzentrationen die pAKT-Proteinspiegel im Vergleich zur Kontrolle, wobei in einem von drei Experimenten die maximale Inhibition der pAKT-Proteinspiegel bereits mit 1,25 μM LY erreicht schien (Abbildung 28A - C). Die Expression der hypertrophen Marker *COL10A1*, *IHH* und *PTH1R* blieben unter 0,25 μM LY unverändert, zeigte allerdings mit 1,25 μM und 2,5 μM LY einen Trend zur Reduktion (Abbildung 28D). Weder die Expression des osteogenen Markers *ALPL* an Tag 42 noch die ALP-Enzymaktivität im Verlauf der MSC-Chondrogenese wurde durch LY-Behandlung beeinflusst (Abbildung 28E, F). Obwohl auch die mRNA-Spiegel des osteogenen Markers *IBSP* von AKT-

Inhibition unberührt blieben (Abbildung 28G), war IBSP-Protein unter 1,25 μM und 2,5 μM LY in drei unabhängigen MSC-Populationen an allen untersuchten Zeitpunkten interessanterweise deutlich erhöht (Abbildung 28H). Dies stand im Einklang mit den zuvor beobachteten reduzierten *IBSP*-Spiegeln unter verstärkter AKT-Aktivierung. Damit einhergehend schienen unter LY-Behandlung auch die β -Catenin-Proteinspiegel als essentielle Komponente des

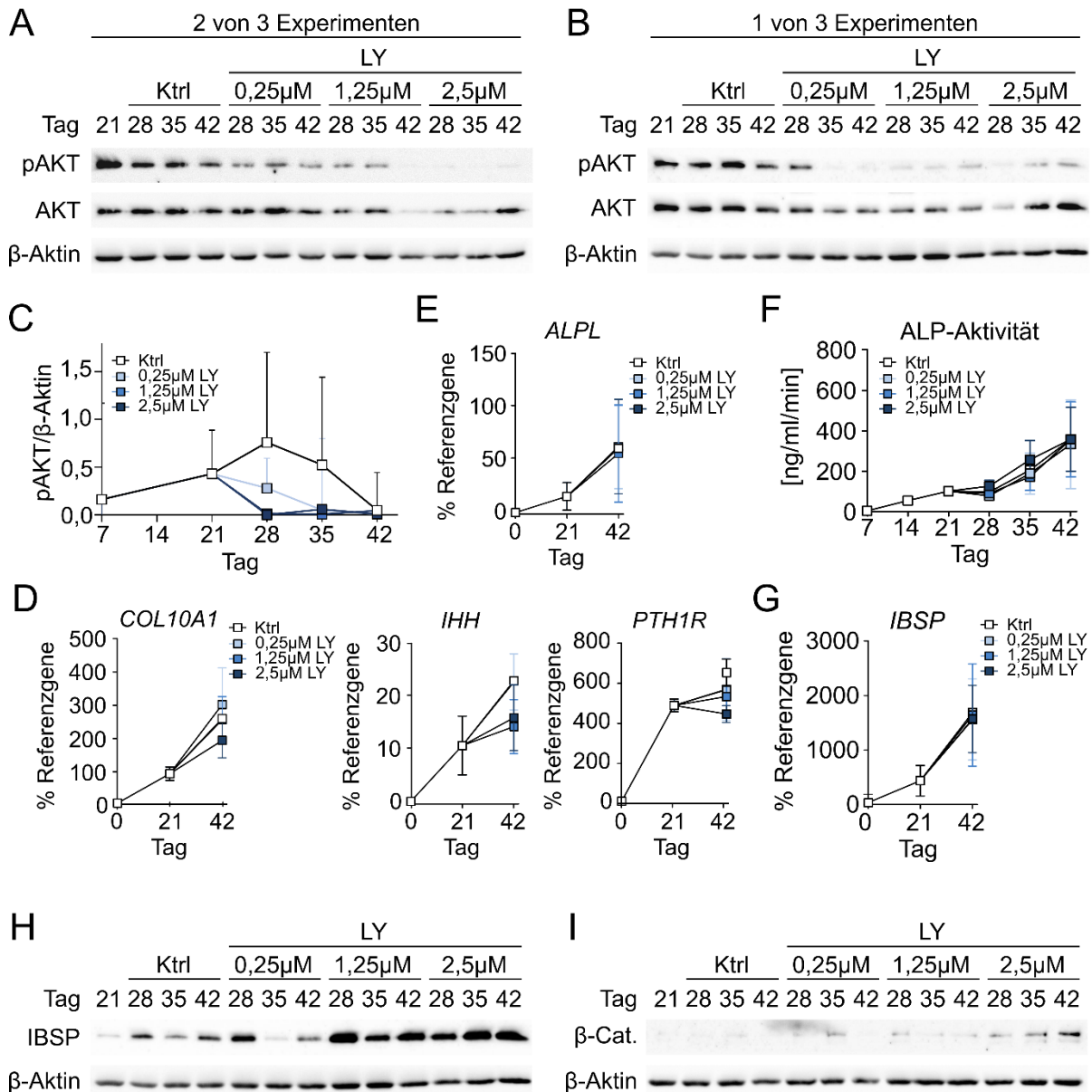


Abbildung 28: Effekt von reduzierter AKT-Aktivierung auf die hypertrophe Differenzierung während der MSC-Chondrogenese. MSC-Pellets wurden ab Tag 21 der Chondrogenese mit 0,01% DMSO (Ktrl), 0,25 μM , 1,25 μM oder 2,5 μM LY behandelt und Effekte auf Hypertrophie in MSC-basierten Chondrozyten untersucht. (**A, B**) pAKT- und AKT-Proteinspiegel wurden mittels Westernblot bestimmt. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Gezeigt werden zwei von insgesamt drei unabhängigen Experimenten; n = 3. (**C**) Densitometrische Analyse der pAKT-Proteinbanden bezogen auf die Bandendichte von β -Aktin in Abhängigkeit von LY-Behandlung. Mediane \pm SEM. (**D, E, G**) Tag-42-Genexpression der hypertrophen Marker *COL10A1*, *IHH* und *PTH1R* und der osteogenen Marker *ALPL* und *IBSP* mit *CPSF6* und *RPL13* als Referenzgenen; n = 3. (**F**) Die ALP-Enzymaktivität wurde in wöchentlichen Abständen in vereinten Zellkulturüberständen von 4 Pellets pro Experiment bestimmt. Mittelwerte \pm SEM, n=3. (**H, I**) Westernblot-Detektion von IBSP (n = 3) und β -Catenin (β -Cat., n = 1). N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger Spenderpopulationen; MWU. Die Teilabbildungen 28A, C, D, F und G wurden in Klampfleuthner et al. 2022 veröffentlicht.

kanonischen, pro-hypertrophen WNT-Signalweges dosisabhängig angehoben (Abbildung 28H; n = 1). Zusammenfassend reduzierte AKT-Inhibition in der späten Chondrogenese konzentrationsabhängig die hypertrophen Marker *COL10A1*, *IHH* und *PTH1R* in geringem Maße, was einen Beitrag von AKT zur frühen enchondralen MSC-Differenzierung vermuten lassen könnte. Während die osteogenen Marker *IBSP* und *ALPL* sowie die ALP-Aktivität unter AKT-Inhibition vollständig unberührt blieben, stiegen die Proteinspiegel von IBSP deutlich an, was darauf hindeutete, dass AKT-Aktivierung die Translation oder Proteinstabilität von IBSP beeinträchtigen könnte.

4.6.5 Bedeutung von AKT-Aktivierung für die chondrogene Differenzierung von MSC

Um herauszufinden, ob die LY-abhängige Reduktion der hypertrophen Marker mit einem verringerten Chondrozytenphänotyp einherging, wurden im Folgenden die Effekte von 0,25 μM , 1,25 μM oder 2,5 μM LY ab Tag 21 auf EZM-Ablagerung und chondrogene Marker an Tag 42 untersucht. Safranin-O-Färbung und Immunhistochemie ließen in allen LY- sowie der Kontrollgruppe auf eine homogene Ablagerung von Proteoglykanen und Kollagen Typ II schließen (Abbildung 29A, B). Während keine Intensitätsunterschiede zwischen LY- und Kontrollpellets in der Kollagen-Typ-II-Färbung ersichtlich waren, erschien die Intensität der Safranin-O-Färbung vor allem in der Pelletperipherie dosisabhängig reduziert (Abbildung 29A, B). Diese

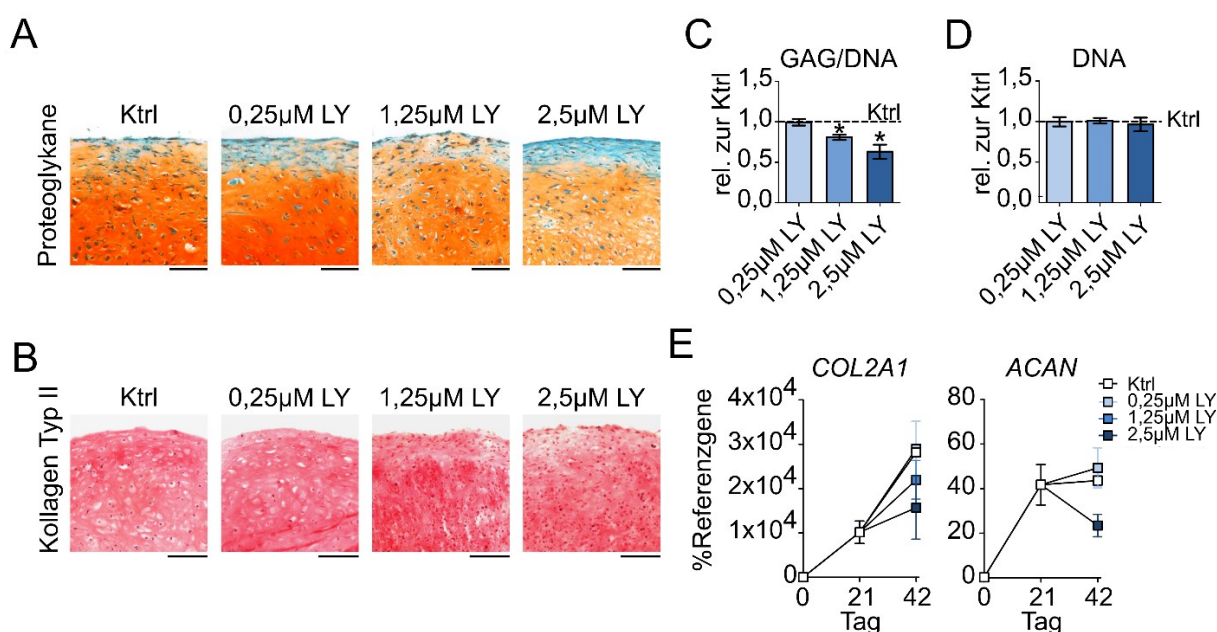


Abbildung 29: Effekt reduzierter AKT-Aktivierung auf die chondrogene Differenzierung in MSC. MSC-Pellets wurden ab Tag 21 der Chondrogenese mit 0,01% DMSO (Ktrl) oder 0,25 μM , 1,25 μM oder 2,5 μM LY behandelt und Effekte auf die MSC-Chondrogenese untersucht. **(A, B)** Mikrotomschnitte von Tag-42-MSC-Pellets nach Safranin-O-Färbung für Proteoglykane und Immunhistochemie für Kollagen Typ II. Maßstabsbalken: 100 μm ; n = 3. **(C, D)** GAG/DNA-Verhältnis: der GAG-Gehalt pro Pellet wurde mittels DMMB-Assay, der DNA-Gehalt mittels PicoGreen-Assay bestimmt. **(E)** Tag 42-Genexpression der chondrogenen Marker *COL2A1* und *ACAN* mit *CPSF6* und *RPL13* als Referenzgenen; n=3. Mittelwerte \pm SEM. N-Angaben beziehen sich auf die Anzahl unabhängiger MSC-Populationen. * p < 0,05; MWU. Veröffentlicht in Klampfleuthner et al. 2022.

Beobachtung spiegelte sich in einem signifikant reduzierten GAG/DNA-Verhältnis bei gleichbleibendem DNA-Gehalt unter 1,25 μM und 2,5 μM LY wider (Abbildung 29C, D). Damit im Einklang standen die im Trend reduzierten mRNA-Spiegel der chondrogenen Marker *COL2A1* und *ACAN* unter 1,25 μM und 2,5 μM LY (Abbildung 29E). Somit wurde die zuvor gezeigte reduzierte Expression hypertropher Marker mit einem Rückgang der chondrogenen Differenzierung unter LY erklärt. Anhand dieser Daten konnte die Funktion des AKT-Signalweges für die MSC-Chondrogenese als „pro-chondrogen“ klassifiziert werden.

4.6.6 Relevanz der AKT-Aktivierung für TGF β -Signaling und SOX9-Proteinakkumulation

Um die pro-chondrogene Rolle der PI3K/AKT-Aktivierung für die MSC-Chondrogenese weiter zu untermauern, wurde im Folgenden der Beitrag des PI3K/AKT-Signalweges zum TGF β /SMAD2-Signaling und der SOX9-Proteinakkumulation untersucht. Hierfür wurden in Zelllysaten von MSC-Pellets unter LY-Behandlung die Proteinspiegel von phosphoryliertem SMAD2 und SOX9 bestimmt. Die Analyse der Westernblots ergab eine dosisabhängige Verringerung der pSMAD2-Spiegel nach Behandlung mit 0,25 - 2,5 μM LY (Abbildung 30A) und eine starke Reduktion unter 25 μM LY (Abbildung 30B). Auch die SMAD2-Proteinspiegel schienen mit zunehmender LY-Konzentration leicht reduziert (Abbildung 30A, B). Darüber hinaus verringerten 2,5 μM oder 25 μM LY die SOX9-Proteinspiegel an allen untersuchten Zeitpunkten, während 0,25 μM oder 1,25 μM LY nicht für eine Reduzierung der SOX9-Spiegel ausreichten (Abbildung 30C, D). Diese Daten belegten, dass die Aktivität des PI3K/AKT-Signalweges entscheidend war für adäquates TGF β -induziertes SMAD2-Signaling und die

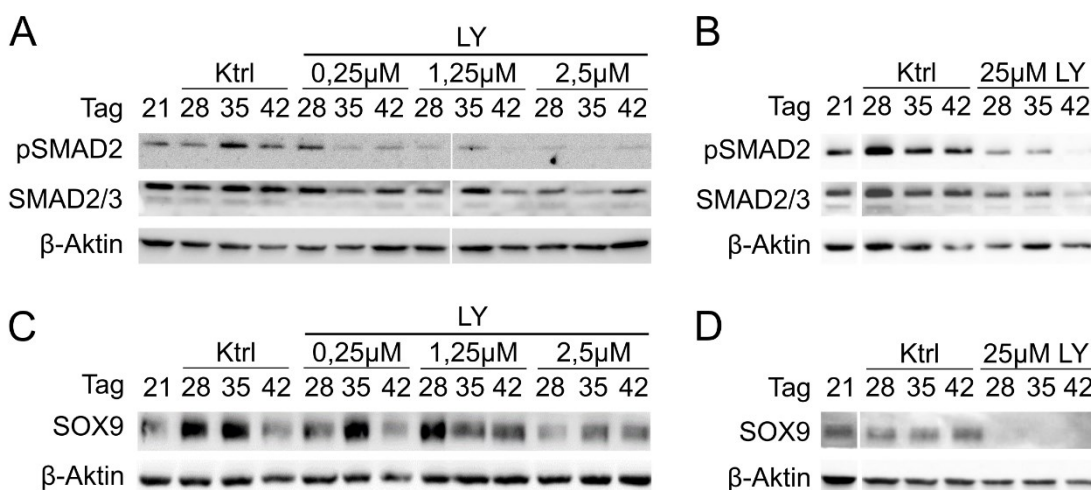


Abbildung 30: Beitrag von AKT-Aktivierung zu pro-chondrogenem TGF β -Signaling und SOX9-Proteinakkumulation. MSC-Pellets wurden ab Tag 21 der Chondrogenese mit den angegebenen LY- oder den entsprechenden DMSO-Konzentrationen behandelt (A, C: 25 μM LY oder 0,1% DMSO (Ktrl); B, D: 0,25 - 2,5 μM LY oder 0,01% DMSO (Ktrl)). Die Proteinspiegel für pSMAD2, SMAD2/3 (A, B) und SOX9 (C, D) wurden mittels Westernblot bestimmt. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Alle Proben einer Teilabbildung wurden auf dasselbe Gel geladen und auf derselben Membran detektiert. Gezeigt wird ein repräsentatives von insgesamt drei Experimenten mit unabhängigen MSC-Populationen (n = 3). Veröffentlicht in Klampfleuthner et al. 2022.

Akkumulation des Transkriptionsfaktors SOX9, zwei unabdingbaren Voraussetzungen für eine erfolgreiche MSC-Chondrogenese. Dies untermauerte die pro-chondrogene Funktion von AKT für die chondrogene Differenzierung von MSC.

5 Diskussion

Eine Haupteinschränkung der Verwendung von MSC für das Knorpel-Tissue-Engineering ist ihre im Gegensatz zu AC enchondrale Differenzierung in einen hypertrophen Chondrozytenphänotyp. Um MSC während der *In-vitro*-Knorpelneogenese in einen AC-ähnlichen Phänotyp differenzieren zu können, ist ein tiefgründiges Verständnis über relevante Signalwege nötig, die wie TGF β , BMP und FGFR die Geschwindigkeit der MSC-Chondrogenese regulieren oder wie WNT spezifisch die Hypertrophie fördern. In diesem Kontext blieb die Funktion des PI3K/AKT-Signalweges für die chondrogene MSC-Differenzierung bisher überraschenderweise unklar, obwohl er bekanntermaßen die Chondrozytenhypertrophie in der Wachstumsfuge vermittelt, entscheidend zur EZM-Ablagerung isolierter Chondrozyten beiträgt und während der Knorpelneogenese *in vitro* kontinuierlich durch Insulin stimuliert wird. Die hier vorliegende Arbeit zeigte zum ersten Mal, dass MSC mit niedrigerer AKT-Aktivierung in die Knorpelneogenese starteten als AC, was die frühe Proteoglykanablagerung pro Zelle zu beeinträchtigen schien und vor verstärktem Zellverlust schützte. Wie in der aus dieser Arbeit hervorgegangenen Publikation erstmalig beschrieben (Klampfleuthner et al. 2022), wurde die AKT-Aktivierung im Verlauf der Knorpelneogenese interessanterweise stark unterschiedlich reguliert und stieg in chondrogen differenzierenden MSC transient an, während die initial hohen pAKT-Spiegel in der AC-Redifferenzierung schnell abnahmen. Diese inverse Regulation war insofern bemerkenswert, als dass andere bisher untersuchte Signalwege einen nahezu identischen Aktivitätsverlauf während der Re-/Differenzierung von MSC und AC zeigten, wie das speziell für die TGF β -, BMP- oder WNT-Signalwege berichtet wurde (Dexheimer et al. 2016; Diederichs et al. 2019). Zur steigenden AKT-Aktivierung in der MSC-Chondrogenese trug im Gegensatz zu TGF β -Behandlung oder endogenem BMP- oder WNT-Signaling die FGFR-Aktivität bei, womit AKT von einem Signalweg kontrolliert wurde, der *in vitro* die chondrogene Differenzierungsgeschwindigkeit von MSC reguliert. Trotz des inversen Verlaufs der AKT-Aktivierung, der eine pro-hypertrophe AKT-Funktion für die MSC-Chondrogenese hätte vermuten lassen können, trieb AKT anders als in der Wachstumsfuge nicht spezifisch die hypertrophe Entwicklung, sondern war in der späten MSC-Chondrogenese essentiell für die Aufrechterhaltung des Chondrozytenphänotyps und der Knorpelbildung, was in der aus dieser Dissertation entstandenen Veröffentlichung erstmalig dokumentiert wurde (Klampfleuthner et al. 2022). Mechanistisch untermauert wurde diese pro-chondrogene AKT-Funktion durch die Erkenntnis, dass AKT-Aktivierung für adäquate TGF β /SMAD2-Signalwegaktivität und SOX9-Proteinakkumulation notwendig war .

Weitere Untersuchungen sind nötig um unser Verständnis von enchondralen Differenzierungsprozessen zu erweitern und es langfristig zu ermöglichen, die Ausbildung eines hypertrophen Chondrozytenphänotyps während der MSC-Chondrogenese besser zu kontrollieren und MSC für die klinische Anwendung in der Knorpelregeneration zu verwenden. Aufgrund der hier beschriebenen Erkenntnisse sollten alle künftigen Versuche, MSC in einen AC-ähnlichen

Chondrozytenphänotyp zu differenzieren, darauf abgestimmt sein, die Induktion und Aufrechterhaltung der AKT-Aktivierung während der chondrogenen MSC-Differenzierung *in vitro* zu ermöglichen, um eine erfolgreiche Knorpelneogenese mit MSC zu erreichen.

5.1 Abhängigkeit der AKT-Aktivierung vom Differenzierungsstadium

Eine interessante und neuartige Entdeckung dieser Arbeit war – wie bereits in der aus dieser Arbeit entstandenen Veröffentlichung (Klampfleuthner et al. 2022) diskutiert - die inverse Regulation der AKT-Aktivierung unter identischer Stimulation von MSC und AC ohne kausale Verbindung zur Hypertrophie-Entwicklung während der *In-vitro*-Knorpelneogenese. Hohe pAKT-Spiegel waren dedifferenzierten und früh redifferenzierenden AC sowie chondrogen differenzierenden MSC in der mittleren Differenzierungsphase (mit variabler Klimax zwischen Tag 7 und 28) gemein, während sie in beiden Zelltypen mit zunehmender Chondrozytenreife abnahmen. Laut früherer Daten unserer Arbeitsgruppe folgen auf einen anfänglichen Wachstumsstopp zu Beginn der MSC-Chondrogenese der Wiedereintritt in die Proliferation und der Beginn der EZM-Ablagerung zwischen Tag 10 und 21 der Knorpelneogenese (Dexheimer et al. 2012). Somit fiel die Phase der hohen AKT-Aktivierung offenbar mit dem Stadium proliferierender Chondroblasten zusammen. Dies deutete darauf hin, dass die Regulation des AKT-Signalweges nicht von der eingeschlagenen Differenzierungsrichtung, sondern eher vom Differenzierungsstadium der Zellen abhängig war. Somit schienen undifferenzierte MSC durch eine niedrige AKT-Aktivierung gekennzeichnet zu sein, während die pAKT-Spiegel simultan zur Differenzierung in proliferierende Chondroblasten sukzessive anstiegen und mit Erreichen des Stadiums differenzierter Chondrozyten wieder abnahmen. Diese Beobachtung stand im Einklang mit der hohen AKT-Aktivierung zu Beginn der Knorpelneogenese in AC, die im Gegensatz zu MSC als dedifferenzierte Chondrozyten dem Stadium proliferierender Chondroblasten bereits sehr nah sind. Auch in Entwicklungsstudien an Mäusen wurde mittels immunhistochemischen Nachweises beobachtet, dass hohe pAKT-Spiegel in ruhenden und proliferierenden Chondrozyten der Wachstumsfuge mit voranschreitender Differenzierung in hypertrophe Chondrozyten stark abnahmen (Ikegami et al. 2011; Kita et al. 2008). In der chondrogenen Mauszelllinie ATDC5 war die Insulin-induzierte Akt-Aktivierung in proliferierenden Chondrozyten ebenfalls hoch und im differenzierten, hypertrophen Chondrozytenstadium reduziert (Phornphutkul et al. 2006). Da die Expression des Insulinrezeptors nach Insulinbehandlung abnahm, schlugen die Autoren eine Insulin-induzierte Reduktion des Rezeptors als möglichen Mechanismus vor. Während dieser Mechanismus auf die hier beobachtete abnehmende AKT-Aktivierung in AC zutreffen könnte, schien er nicht mit den transient ansteigenden pAKT-Proteinspiegeln während der MSC-Chondrogenese in Einklang zu stehen. Da MSC die AKT-Aktivität reduzierten, wenn sie das Chondrozytenstadium erreicht hatten, deutete dies

eher auf einen AKT-regulierenden Mechanismus hin, der vom Differenzierungsstadium der Zellen abhing und zu einer hohen AKT-Aktivierung in proliferierenden Chondroblasten führte.

5.2 Bedeutung ausgewogener AKT-Aktivierung für die frühe MSC-Chondrogenese

In Anbetracht der hohen pAKT-Spiegel zu Beginn der AC-Redifferenzierung wurde zusätzlich zu den in Klampfleuthner et al. publizierten Daten in dieser Studie untersucht, ob eine Erhöhung der initial niedrigen AKT-Aktivierung die MSC-Chondrogenese beschleunigen könnte. Unter den drei untersuchten potentiellen AKT-Agonisten war FGF2 zu Beginn der Chondrogenese überraschenderweise kein Induktor der AKT-Phosphorylierung. Dies war insofern unerwartet, als dass eine Behandlung mit 5 – 25 ng/ml FGF2 die pAKT-Spiegel in verschiedenen Zellsystemen wie humanen Krebs- oder Fibroblasten-Zelllinien und embryonalen Maus-Fibroblasten bis zu 12 Stunden deutlich erhöhte (Lau et al. 2013; Lin et al. 2011; Penke et al. 2018; Quan et al. 2020). Interessanterweise waren die pAKT-Spiegel auch in humanen Stammzellen aus Fettgewebe gesteigert, die während zwei-wöchiger adipogener Differenzierung zusätzlich zu 10 µg/ml Insulin in der Kontrollgruppe auch mit 100 ng/ml FGF2 behandelt wurden (Lu et al. 2020). Im Einklang mit der hier beobachteten ausbleibenden AKT-Aktivierung durch FGF2 zu Beginn der MSC-Chondrogenese blieben die pAKT-Spiegel in neuronalen Stammzellen aus Mäuseembryos oder humanen Leberendothelzellen nach Behandlung mit 1 bis 10 ng/ml FGF2 für 15 Minuten oder 12 Stunden unverändert (Adepoju et al. 2014; Zou et al. 2012). Zusammenfassend war die FGF2-induzierte AKT-Phosphorylierung in der Literatur als stark zellkontextabhängig beschrieben und zu Beginn der MSC-Chondrogenese nicht evident.

Im Gegensatz zu FGF2 ermöglichte die Behandlung mit Insulin oder PDGF-BB zu Beginn der Knorpelneogenese mit MSC eine robuste Aktivierung des AKT-Signalweges. Interessanterweise führte PDGF-BB zu einer kurzfristigen und Insulin zu einer länger anhaltenden AKT-Phosphorylierung. Die hier gezeigte schnelle, aber kurz anhaltende AKT-Aktivierung durch PDGF-BB wurde auch in embryonalen Maus-Fibroblasten (Park et al. 2003; Tan et al. 2012) und in einer humanen Leberkrebs-Zelllinie beschrieben, in der die PDGF-vermittelte PIP3-Synthese in Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten innerhalb von einer Stunde induziert wurde (Jones et al. 1999). Ein direkter Vergleich der AKT-Aktivierung durch PDGF-BB und Insulin in einer Rattenretina-Zelllinie ergab wie auch hier gezeigt eine schnelle, kurze pAKT-Induktion durch PDGF-BB und eine anhaltende Erhöhung der AKT-Aktivierung durch Insulin (Biswas et al. 2008). Die spezifische Geschwindigkeit, mit der PDGF-BB oder Insulin ihren jeweiligen Rezeptor binden und AKT aktivieren, ist beispielsweise vom stöchiometrischen Rezeptor/Liganden-Verhältnis, der Konzentration von Liganden-spezifischen Schlüssel-molekülen wie Rezeptoren, Adaptorproteinen, aktivierter Kinasen und Phosphatasen oder der Liganden-spezifischen Signalwegmodulation durch negative Feedbackschleifen abhängig (De

Meyts et al. 1995). In welchem Ausmaß diese einzelnen PDGF- oder Insulin-abhängigen Faktoren zur AKT-Aktivierung beitragen, lässt sich aufgrund ihres komplexen Zusammenspiels kaum festlegen. Im Gegensatz dazu für diese Arbeit eindeutig quantifizierbar ist aber, dass für die AKT-Stimulation eine 3600-fach höhere Konzentration an Insulin- verglichen zu PDGF-BB-Molekülen verwendet wurde (Insulin: 1,7 μ M; PDGF-BB: 0,47 nM). Angesichts dieser Tatsache könnte einerseits spekuliert werden, dass sich durch den Überschuss mehrere Insulinmoleküle um einen IR sammeln, sich gegenseitig an der IR-Bindung hindern und so das AKT-Signal verzögern. Andererseits könnte der hohe Insulinüberschuss wie in ATDC5 und humanen Krebszelllinien zunächst zu einer starken Reduktion der IR-Expression führen (Carpentier et al. 1984; Phornphutkul et al. 2006), um die Zelle vor akuter AKT-Überaktivierung zu schützen. Wenn die IR-Expression anschließend in Abhängigkeit von der extrazellulären Insulinkonzentration wieder graduell ansteigt, würde dies auch zu sukzessiver AKT-Aktivierung führen. Für die gewählte PDGF-Konzentration hingegen könnte ein ausgewogenes Rezeptor/Liganden-Verhältnis eine effiziente und schnelle AKT-Aktivierung ermöglichen.

Unterschiedliche Effekte der initialen AKT-Aktivierung durch Insulin und PDGF-BB zeigten sich in der hier vorliegenden Arbeit in der Genexpression von zwei der insgesamt vier untersuchten Marker. Während eine schnelle pAKT-Induktion durch PDGF-BB zu Beginn der MSC-Chondrogenese *COL2A1* an Tag 7 reduzierte, änderte eine langsamere AKT-Stimulation durch Insulin die *COL2A1*-Spiegel nicht, senkte aber die *IBSP*-Spiegel. Für die embryonale Maus-Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 wurde zwar beschrieben, dass je nach Länge der AKT-Aktivierung unterschiedliche AKT-Substrate in unterschiedlichen Zellkompartimenten induziert werden können, was variable Zellantworten hervorrufen kann (Kunkel et al. 2005). Da die Länge der AKT-Aktivierung in dieser Arbeit jedoch nicht durch variable Behandlungsdauer mit demselben Agonisten moduliert und die Effekte damit nicht eindeutig auf die Signaldauer zurückgeführt wurden, könnten die beobachteten unterschiedlichen Effekte auch schlichtweg aus der Verwendung unterschiedlicher AKT-Agonisten resultieren.

Unabhängig vom verwendeten Agonisten war eine Folge der initialen AKT-Stimulation eine vermehrte Proteoglykanablagerung pro Zelle bei überraschenderweise verstärktem Zellverlust. Möglicherweise war dies das Ergebnis eines Selektionsprozesses durch erhöhte AKT-Aktivierung, bei dem auf Kosten der verbleibenden Zellsubpopulation hauptsächlich diejenigen Zellen den Wechsel von Monolayer- zu 3D-Pelletkultur überlebten, die zu frühen Zeitpunkten der Knorpelneogenese in der Lage sind, chondrogene Stimuli effizient in GAG-Ablagerung umzuwandeln. Da der verstärkte Zellverlust sowohl bei initialer Behandlung mit Insulin oder PDGF-BB als auch unter verlängerter Behandlung mit hoher Insulindosis, PDGF-BB, IGF1 oder LR3-IGF in unabhängigen Experimenten auftrat, war dies ein robuster, wiederkehrender Effekt. Eine generelle Selektion von Chondroprogenitoren durch AKT-Stimulation stellte dies aber nicht dar, da in diesem Fall auch erhöhte *COL2A1*-Spiegel zu erwarten gewesen wären. Trotz Erhöhung der frühen Proteoglykanproduktion pro Zelle war der verstärkte Zellverlust

nach initialer AKT-Stimulation gänzlich unerwünscht. Von einer ähnlichen Beobachtung wurde in humanen MSC aus Fettgewebe berichtet, in denen 48-stündige Behandlung mit 100 nM Insulin, was nur 6% der in dieser Arbeit verwendeten Insulindosis entsprach, die Apoptoserate in Monolayer-Kultur signifikant erhöhte (Scioli et al. 2014). Die Autoren führten dies auf eine AKT-vermittelte Inhibierung von FGFR1/ERK-Signaling zurück, die ebenfalls in humanen Brustkrebs-Zelllinien oder der Mausmyoblasten-Zelllinie C2C12 beschrieben wurde (Moelling et al. 2002; Rommel et al. 1999; Yao et al. 2019). Auch für die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten MSC aus Knochenmark ist durch frühere Studien unserer Arbeitsgruppe bekannt, dass FGF2/ERK-Signalwegaktivität in der Expansionskultur die Proliferation steigert (Hagmann et al. 2013) und eine hohe Proliferationsrate zu Beginn der Chondrogenese den frühen Zellverlust im Pellet reduzierte (Dexheimer et al. 2012). Die Autoren schlussfolgerten, dass ein aktiver Metabolismus und eine hohe Proliferationsaktivität zu Beginn der MSC-Chondrogenese essentiell war, damit möglichst viele Zellen den anspruchsvollen Übergang von Expansionskultur zu hoher Zelldichte in der Pelletkultur überlebten. Somit könnte die initiale AKT-Stimulation mit PDGF-BB oder einer supraphysiologischen Insulinkonzentration wie auch für MSC aus Fettgewebe vorgeschlagen (Scioli et al. 2014) die ERK-Signalaktivität und somit die Proliferation in dieser entscheidenden Übergangsphase derart reduziert haben, dass die Zellen den Wechsel zur Pelletkultur seltener überlebten. Aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse bleibt also festzuhalten, dass eine Überstimulation der initialen AKT-Aktivierung undifferenzierten MSC den Übergang von Expansions- zu 3D-Pelletkultur zusätzlich erschwerte und so den Zellverlust verstärkte. Die niedrige AKT-Aktivierung zu Beginn der MSC-Chondrogenese schien somit keine wesentliche Beeinträchtigung der Differenzierung darzustellen, der entgegengewirkt werden müsste, sondern vielmehr einen anti-apoptotischen Schutzmechanismus darzustellen.

5.3 Regulation der differenzierungsabhängigen AKT-Aktivierung durch TGF β und FGFR-Aktivität

Im Einklang mit der Chondrogenese-stimulierenden AKT-Funktion wurde die AKT-Aktivierung mit TGF β und FGFR durch zwei Signalmoleküle moduliert, die ebenfalls die chondrogene Differenzierungsgeschwindigkeit regulieren. Obwohl TGF β in humanen AC, humanen Krebszelllinien oder mesenchymalen Mauszellen als AKT-Stimulator beschrieben wurde (Cheng et al. 2014; Qureshi et al. 2007; Walker et al. 2013) wirkte TGF β während der MSC-Chondrogenese überraschenderweise eher inhibierend und der differenzierungsabhängige Anstieg der AKT-Aktivierung wurde nicht durch TGF β induziert, was auch in der aus dieser Dissertation entstandenen Publikation dokumentiert wurde (Klampfleuthner et al. 2022). Ein inhibierender TGF β -Effekt wurde in einer humanen Krebszelllinie beschrieben, in der TGF β die PTEN-Proteinspiegel erhöhte und so die AKT-Phosphorylierung inhibierte (Kimbrough-Allah et al. 2018). Da die *PTEN*-Genexpressionsspiegel unverändert blieben, war dies offenbar ein post-

/translationaler Effekt. Da die *PTEN*-Expression laut Microarray-Daten unserer Arbeitsgruppe während der TGF β -induzierten MSC-Chondrogenese nicht anstieg, wäre ein post-/translationaler Mechanismus der TGF β -abhängigen *PTEN*-Induktion auch für die MSC-Knorpelneogenese denkbar. Ein weiterer potentieller Mechanismus zur TGF β -induzierten AKT-Inhibierung wurde in einer Mauslymphozyten-Zelllinie beschrieben, in der TGF β /Smad2/3/4-Signaling die Genexpression der PIP3-Phosphatase *SHIP* induzierte (Valderrama-Carvajal et al. 2002). Als Folge der *SHIP*-vermittelten Reduktion der PIP3-Spiegel war auch die AKT-Aktivierung beeinträchtigt. Der vorgeschlagene Mechanismus einer TGF β /*SHIP*-abhängigen AKT-Inhibition ist auch für die chondrogene MSC-Differenzierung denkbar, da laut Microarray-Daten die *SHIP*-Expression im Verlauf der MSC-Chondrogenese unter TGF β anstieg. Da Insulin während der Knorpelneogenese in supraphysiologischen Konzentrationen vorhanden ist und AKT ohne regulierende Mechanismen bis zu einem schädlichen Maß aktiviert werden könnte, agiert TGF β möglicherweise als AKT-regulierender Gegenspieler und schützt die Zelle so vor übermäßiger AKT-Aktivierung.

Da FGF2/FGFR-Stimulation wie hier erstmalig dokumentiert zu Beginn der MSC-Chondrogenese die AKT-Phosphorylierung nicht steigern konnte, war der Beitrag des endogenen FGFR-Signalings zur AKT-Aktivierung im Verlauf der chondrogenen MSC-Differenzierung unerwartet hoch. In Einklang mit der hier beobachteten reduzierten AKT-Aktivierung unter FGFR-Inhibition wurden auch in humanen oder Mausbrustkrebs-Zelllinien verringerte pAKT-Proteinspiegel durch bis zu 500 nM PD beschrieben (Chew et al. 2020; Qian et al. 2014; Valacca et al. 2015). Im Gegensatz dazu berichteten weitere Studien mit anderen humanen Krebszelllinien allerdings von einer unveränderten oder erhöhten AKT-Aktivierung unter vergleichbarer PD-Behandlung (Englinger et al. 2018; Nguyen et al. 2013). Die PD-vermittelten Effekte auf AKT-Phosphorylierung schienen somit je nach Zellkontext zu variieren und während der MSC-Chondrogenese vom Differenzierungsstadium abhängig zu sein.

Der Rückgang der AKT-Aktivität bei beschleunigter chondrogener Differenzierung unter FGFR-Inhibition schien zunächst nicht mit einer pro-chondrogenen AKT-Rolle vereinbar. Zwar waren die pAKT-Spiegel unter PD insgesamt reduziert, das Maximum der AKT-Aktivierung in zwei von drei unabhängigen Experimenten aber interessanterweise früher erreicht als unter Kontrollbedingungen. Damit einhergehend, dass chondrogen induzierte MSC unter FGFR-Inhibition das Stadium proliferierender Chondroblasten bekanntermaßen schneller erreichen, könnte somit auch die früher einsetzende AKT-Phosphorylierung, die koinzident zur steigenden Proliferationsaktivität auftritt, auf die schnellere Differenzierung zurückzuführen sein. Obwohl zunächst kontraintuitiv, schien sich die verfrühte AKT-Aktivierung unter beschleunigter Differenzierung doch mit der Hypothese vereinbaren zu lassen, dass die AKT-Aktivierung während der Knorpelneogenese vom Differenzierungsstadium der Zellen abhängig war.

5.4 AKT als Regulator der chondrogenen Differenzierungsgeschwindigkeit

Wie für AC-Kulturen bekannt zeigte sich hier die PI3K/AKT-Aktivierung in der späten Phase der MSC-Chondrogenese als essentiell für die Knorpelmatrixablagerung und darüber hinaus für die Aufrechterhaltung des Chondrozytenphänotyps. Wie TGF β ist der PI3K/AKT-Signalweg somit ein Stimulator der chondrogenen Differenzierungsgeschwindigkeit in MSC, was erstmalig in der aus dieser Dissertation entstandenen Publikation veröffentlicht wurde (Klampfleuthner et al. 2022). Zum ersten Mal für die *In-vitro*-Knorpelneogenese beschrieben war eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit, dass die PI3K/AKT-Aktivierung essentiell für adäquates TGF β /SMAD2-Signaling und die SOX9-Proteinakkumulation war, was eine pro-chondrogene Rolle von AKT mechanistisch untermauerte. Über Signalweginteraktionen zwischen PI3K/AKT und TGF β wurde in verschiedenen Zellen und Geweben berichtet, die je nach Zellkontext sowohl stimulierend als auch hemmend sein konnten (Danielpour und Song 2006; Luo 2017). Eine AKT-vermittelte Stimulation von TGF β -Signaling wurde in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien beschrieben, in denen AKT das deubiquitylierende Enzym Ubiquitin-spezifische Protease 4 (USP4) aktivierte. Dies führte zu einem reduzierten Ubiquitylierungs-abhängigen Abbau des TGF β RI und somit verstärkter TGF β -Signalwegaktivität (Zhang et al. 2012). In einer Hundenerien-Zelllinie steigerte AKT-Aktivität die SMAD2-Transkription über Aktivierung des Transkriptionsfaktors Twist1 und förderte so die TGF β -Signalwegaktivität (Xue et al. 2012), was im Einklang steht mit den hier beobachteten niedrigeren SMAD2-Spiegeln unter PI3K/AKT-Inhibition. Wie auch in der aus dieser Arbeit entstandenen Publikation Klampfleuthner et al. kurz thematisiert, verstärkte phosphoryliertes AKT in humanen Nieren- oder Krebszelllinien sowie einer Mausepithel-Zelllinie die TGF β -Signalwegaktivität, indem es die Bindung von SMAD2/3 an den TGF β R1 unterstützte (Bakin et al. 2000; Miura et al. 2000; Thien et al. 2015; Tsukazaki et al. 1998). Je nach Zellkontext wurde dies über TSC1, *hepatic growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hgs)* oder über den SMAD-Ko-Faktor SARA vermittelt. Diese drei vorgeschlagenen Schlüsselfaktoren könnten auch für die mechanistische Aufklärung der in dieser Arbeit beobachteten Abhängigkeit des TGF β /SMAD2-Signalweges von AKT-Aktivierung relevant sein. Die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges für die SOX9-Expression und -Proteinakkumulation wurde in Übereinstimmung mit den hier beschriebenen Beobachtungen auch für humane AC, Chondrozyten der menschlichen fötalen Wachstumsplatte und Nucleus-pulposus-Zellen berichtet (Cheng et al. 2009; Fernandez-Cancio et al. 2008; Yin et al. 2009). Auch in Abwesenheit von TGF β erhöhte konstitutiv aktives AKT die SOX9- und somit die *COL2A1*-Expression in Monolayerkultur humaner AC (Lefebvre et al. 1997; Yin et al. 2009), was auf eine pro-chondrogene AKT-Funktion hindeutete, die über die Rolle eines bloßen Vermittlers der TGF β -Signalübertragung hinausging.

Aufgrund der starken Belege einer pro-chondrogenen AKT-Funktion *in vitro* erschien es zunächst überraschend, dass derartige anabole AKT-Effekte *in vivo* nicht ersichtlich waren. So berichteten Studien an Mäusen, in denen die Gene für *Igf1*, *Igf1r*, *Ir*, *Pi3k* oder *Akt* als wichtige

Komponenten des PI3K/AKT-Signalweges inaktiviert wurden, zwar von Defekten in der Wachstumsfuge, aber nicht von einer Beeinträchtigung der Proteoglykanablagerung (Cooper et al. 2013; Fukai et al. 2010; Heilig et al. 2016; Liu et al. 1993; Louvi et al. 1997; Peng et al. 2003; Ulici et al. 2009; Wang et al. 1999; Wang et al. 2011). Wie auch in Klampfleuthner et al. 2022 diskutiert könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass der Verlust eines einzelnen Gens in einem komplexen *In-vivo*-Setting mit vielfältigen Wechselwirkungen leicht durch alternative Rezeptoren, Liganden oder Isoformen des Effektors kompensiert werden kann. Dies wurde durch eine Studie verdeutlicht, in der *Ir*-Deletion in isolierten, *in vitro* kultivierten Rippen-Chondrozyten neugeborener Mäuse die *Sox9*-Spiegel und die Proteoglykanablagerung reduzierte, in Chondrozyten der Wachstumsfuge aber keinen vergleichbaren Effekt hatte (Zhang et al. 2014). Somit scheint die Notwendigkeit der PI3K/AKT-Aktivierung für die Knorpelneogenese *in vitro* stärker ausgeprägt zu sein, da in definierten Kultursystemen viele der *in vivo* möglichen Kompensationsmechanismen nicht ablaufen können.

5.5 Hinweise auf eine multifaktorielle AKT-Funktion für die MSC-Chondrogenese

Obwohl sich die enchondrale Chondrozytendifferenzierung *in vivo* und die MSC-Chondrogenese *in vitro* in vielen Aspekten ähneln, wurde hier als wichtiger Unterschied aufgedeckt, dass der AKT-Signalweg während der chondrogenen MSC-Differenzierung im Gegensatz zur Wachstumsfuge keine pro-hypertrophe Funktion erfüllte. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit vielfältigen unabhängigen Beobachtungen, die in dieser Arbeit und der daraus entstandenen Publikation beschrieben wurden. Erstens war der AKT-Signalweg zu Beginn der Knorpelneogenese, wenn die Determinierung der enchondralen statt chondralen Entwicklungslinie stattfindet, in MSC deutlich schwächer aktiviert als in AC, was es unwahrscheinlich erschienen ließ, dass AKT die Wahl der enchondralen Differenzierungsrichtung treibt. Zweitens regulierte nicht pro-hypertroph wirkendes WNT-Signaling, sondern die geschwindigkeitsregulierenden TGF β und FGFR die AKT-Aktivierung. Drittens waren unter PI3K/AKT-Inhibition neben hypertrophen auch chondrogene Marker reduziert, was AKT als spezifisch pro-hypertrophen Effektor ausschloss. Viertens war AKT-Aktivierung für TGF β /SMAD2-Signaling und SOX9-Proteinakkumulation notwendig, zwei essentiellen pro-chondrogenen Stimuli. Somit war die PI3K/AKT-Inhibition kein geeignetes Mittel, um die Hypertrophie während der MSC-Chondrogenese zu reduzieren, ohne den Chondrozytenphänotyp zu beeinträchtigen, was erstmalig in der aus dieser Arbeit entstandenen Publikation berichtet wurde (Klampfleuthner et al. 2022). Dies stand im Einklang mit Studien, in denen IGF1-Überexpression in humanen oder bovinen MSC neben hypertrophen und osteogenen Markern wie *COL10A1* oder *ALPL* auch die chondrogenen Marker *SOX9* und *COL2A1* sowie die Proteoglykan- und Kollagen-Typ-II-Ablagerung erhöhte (Frisch et al. 2014; Steinert et al. 2009). Diese Studien bekräftigten eine pro-chondrogene statt pro-hypertrophe AKT-Rolle für die MSC-Chondrogenese. Vor diesem Hintergrund

mag es zunächst überraschend erscheinen, dass PI3K/AKT-Aktivierung in osteogen differenzierenden MSC die ALP-Aktivität, Gewebemineralisierung, Osteopontin- und Osteocalcin-Proteinspiegel stimulierte, Charakteristika, die Osteoblasten und hypertrophe Chondrozyten gemein haben (Baker et al. 2015; Xia et al. 2019; Ye et al. 2019; Zhang et al. 2016). Ein Hauptunterschied zwischen der osteogenen und chondrogenen MSC-Differenzierung jedoch ist die Anwendung von TGF β , das in der Knorpelneogenese *in vitro* stets in hohen Mengen zur Verfügung steht und dessen Aktivität laut der vorliegenden Studie durch PI3K/AKT verstärkt wurde. Da die ausgeübte AKT-Funktion von der Art der Aktivierung und Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen abhängen kann, ist es durchaus denkbar, dass AKT in der Abwesenheit von TGF β differenzierende MSC in anderer Weise beeinflusst als mit TGF β der Fall (ebenfalls diskutiert in Klampfleuthner et al. 2022). Vergleichbar zur TGF β -freien MSC-Osteogenese wird der TGF β -Signalweg in der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge laut geringerer TGF β RI-Proteinspiegel und SMAD2/3-Aktivierung nur geringfügig induziert (Wang et al. 2019). Dies erlaubt zu spekulieren, dass AKT in der Abwesenheit von TGF β durchaus pro-hypertroph agieren könnte. Damit im Einklang steht die Beobachtung, dass nach abgebrochener TGF β -Behandlung während der MSC-Chondrogenese neben der AKT-Aktivierung auch die ALP-Aktivität anstieg (Dreher et al. 2020). Da eine Verstärkung des hypertrophen Chondrozytenphänotyps in dieser Arbeit aber unerwünscht war, wurde die Hypothese einer pro-hypertrophen AKT-Funktion in Abwesenheit von TGF β nicht experimentell überprüft.

Eine weitere, bisher unpublizierte Neuheit dieser Arbeit, die die Komplexität der AKT-Funktion für die MSC-Chondrogenese unterstrich, war die überraschende Beobachtung, dass initiale AKT-Überstimulation mit Insulin die *IBSP*-Expression reduzierte, während AKT-Inhibition die *IBSP*-Proteinspiegel in der späten MSC-Chondrogenese erhöhte. Dass dies kein allgemeiner anti-osteogener AKT-Effekt war, zeigte sich daran, dass andere osteogene und hypertrophe Marker unter Insulin-Überstimulation und Inhibition mit LY unverändert blieben. Aufgrund der Tatsache, dass die *IBSP*-Genexpressionsspiegel unter AKT-Inhibition nicht anstiegen, waren die erhöhten *IBSP*-Proteinspiegel vermutlich auf verstärkte Translation oder post-translationale Protein-stabilisierende Modifikationen zurückzuführen, in die AKT direkt oder indirekt involviert sein könnte. Zu Beginn der Chondrogenese regulierte Insulin *IBSP* jedoch durchaus auf transkriptioneller Ebene. Diese erstmalig beschriebene Inhibition der *IBSP*-Proteinakkumulation durch AKT deutete an, dass AKT neben seiner pro-chondrogenen Rolle möglicherweise auch selektiv anti-osteogen agieren könnte. Die hier erhöhten β -Catenin-Proteinspiegel unter AKT-Inhibition deuteten an, dass kanonisches WNT-Signaling an der AKT-abhängigen Regulation der *IBSP*-Proteinspiegel beteiligt sein könnte. Dass AKT neben einer pro-chondrogenen womöglich auch eine selektiv anti-osteogene Funktion erfüllt, ohne jedoch hypertrophe Marker zu beeinflussen, legt eine komplexe, multifaktorielle Rolle von AKT für die MSC-Chondrogenese nahe, die es in zukünftigen Studien weiter aufzuklären gilt. Ein besseres Verständnis darüber, welche Teilaspekte der enchondralen Differenzierung von AKT beeinflusst werden

und welche AKT-Downstream-Targets in diese Regulationen involviert sind, könnte langfristig zur Entwicklung von Differenzierungsprotokollen beitragen, die eine chondrale MSC-Differenzierung ermöglichen.

5.6 Limitierungen der Studie

Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von nativem, gesundem Knorpelgewebe wurden für die Experimente dieser Studie AC verwendet, die aus makroskopisch unauffälligem Knorpelgewebe des Tibiaplateaus und der Femurkondylen von Arthrose-Patientinnen und -Patienten isoliert wurden. Trotz großer Sorgfalt kann nicht ausgeschlossen werden, dass die arthrotische Umgebung im Gelenk den Phänotyp der entnommenen AC beeinflusste. Anhand gründlicher Charakterisierung wurde jedoch nachgewiesen, dass die verwendeten AC während der Knorpelneogenese *in vitro* keinerlei Anzeichen hypertropher Differenzierung zeigten, die aus der arthrotischen Degeneration des Spendergewebes resultieren könnten, was auch in der entstandenen Publikation thematisiert wurde (auch diskutiert in Klampfleuthner et al. 2022).

Die standardmäßige Verwendung der Peptidase Trypsin, um aggregierende MSC während der Expansionskultur vom Boden eines Zellkulturgefäßes zu lösen, stellt eine weitere potentielle Limitierung dieser Studie dar. Als Peptidase spaltet Trypsin Adhäsions- und andere extrazelluläre Matrixproteine auf der Zelloberfläche, was zur Dissoziation der Zellen von einer besiedelten Oberfläche führt. Es ist naheliegend, dass eine Behandlung mit Trypsin auch Rezeptoren auf der Zelloberfläche und sensible molekulare Unterschiede wie temporäre Phosphorylierung nachgeschalteter Kinasen wie der PI3K oder AKT beeinflussen kann, was einen vermeintlich objektiven Vergleich von AKT-Phosphorylierung möglicherweise verfälscht. Die Behandlung mit Trypsin ist außerdem schwer zu standardisieren, weil die Effizienz dieser Peptidase von zahlreichen Parametern wie Anwendungstemperatur, pH und Restaktivität nach Ansetzen der Gebrauchslösung abhängt. Da die pAKT-Spiegel nicht nur nach der Trypsinbehandlung am Ende der Expansion, sondern auch 24 Stunden nach Beginn der Pelletkultur in MSC niedriger waren als in AC, war die abweichende AKT-Aktivierung zu Beginn der Knorpelneogenese ein Trypsin-unabhängiger, robuster Unterschied. Nichtsdestotrotz schien dieser Unterschied in der AKT-Aktivierung unmittelbar nach der Trypsinbehandlung am Ende der Expansion aber deutlich stärker ausgeprägt als an Tag 1 der Pelletkultur und somit 24 Stunden nach der letzten Trypsinbehandlung (291-fach versus 10,8-fach). Ob dies tatsächlich auf die Folgen der Trypsinbehandlung oder auf die Anpassung der pAKT-Spiegel unter chondrogenen Bedingungen in beiden Zelltypen zurückzuführen war, war für diese Studie nicht relevant und wurde nicht weiter untersucht.

Eine weitere vermeintliche Limitierung dieser Studie ist die Verwendung eines künstlichen Inhibitors zur Untersuchung der PI3K/AKT-Relevanz für die MSC-Chondrogenese anstatt die Insulinbehandlung zu reduzieren oder abzusetzen. In diesem Falle könnte aber eine mögliche

Kompensation des Insulinmangels durch zellautonome IGF1-Sekretion oder die Regulation von AKT durch andere Signalwege wie TGF β oder FGFR dazu führen, die AKT-Bedeutung für die chondrogene Differenzierung zu unterschätzen. Deshalb wird die AKT-Funktion oftmals, wie auch in dieser Studie, durch LY-vermittelte PI3K-Inhibition untersucht. Hierbei ist es aber für die Integrität der Ergebnisse wichtig, potentielle Nebeneffekte von LY zu berücksichtigen, da eine LY-vermittelte Inhibition anderer Signalwege und zellulärer Prozesse wiederum zur Überinterpretation der PI3K/AKT-Funktion führen könnte (ebenfalls diskutiert in Klampfleuthner et al. 2022). Für LY betreffen beschriebene Nebeneffekte jedoch entweder AKT-Downstream-Targets wie mTOR1 oder GSK3 β (Bain et al. 2007; Gharbi et al. 2007), deren Inhibition durch LY ohnehin erwartet wurde, oder Regulatoren des Zellzyklus wie CK2, PLK1, PIM1 oder PIM3 (Bain et al. 2007; Davies et al. 2000). Da in einer unserer früheren Studien LY die Proliferation in der späten MSC-Chondrogenese jedoch nicht beeinträchtigte (Fischer et al. 2018), schienen diese für den Zellzyklus relevanten Nebeneffekte von LY für die chondrogene MSC-Differenzierung keine Rolle zu spielen.

5.7 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend wurde mit Hilfe dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass die AKT-Aktivierung während der MSC-Chondrogenese und AC-Redifferenzierung unterschiedlich reguliert war. Da die initial hohen pAKT-Spiegel mit zunehmender AC-Redifferenzierung abnahmen und die AKT-Aktivierung während der MSC-Chondrogenese gleichzeitig zur Proliferation transient anstieg, deutete dies darauf hin, dass die AKT-Aktivierung vom Differenzierungsstadium abhängig war und im Stadium proliferierender Chondroblasten ihr Maximum erreichte. Die zu Beginn der Knorpelneogenese niedrigen pAKT-Spiegel in MSC schienen keine Beeinträchtigung der Differenzierung darzustellen, sondern schützten vor Zellverlust durch AKT-Überstimulation. Die transient steigende AKT-Aktivierung während der chondrogenen MSC-Differenzierung, die nicht von TGF β vermittelt, aber von endogener FGFR-Aktivität gefördert wurde, unterstützte die Aufrechterhaltung des Chondrozytenphänotyps in MSC. Somit wurde AKT als Regulator der chondrogenen Differenzierungsgeschwindigkeit identifiziert. Mechanistisch untermauert wurde diese pro-chondrogene Funktion, da AKT-Aktivierung relevant für adäquates TGF β /SMAD2-Signaling und SOX9-Proteinakkumulation war. Trotz vieler Parallelen zur hypertrophen Chondrozytendifferenzierung in der Wachstumsfuge, agierte AKT während der MSC-Chondrogenese nicht hypertroph, was möglicherweise auf die Inhibition durch TGF β zurückzuführen sein könnte. Dass AKT-Aktivierung während der chondrogenen MSC-Differenzierung die IBSP-Proteinspiegel reduzierte, deutete auf eine multifaktorielle AKT-Funktion für die MSC-Chondrogenese hin, die über eine rein pro-chondrogene Rolle hinausgehen könnte. Auf Grundlage der hier gewonnenen Erkenntnisse zu Verlauf und Funktion von AKT in der MSC-Chondrogenese kann nun in zukünftigen Studien entschlüsselt werden, welche

Teilaspekte der enchondralen Differenzierung von bestimmten AKT-induzierenden und AKT-nachgeschalteten Signalwegen reguliert werden. Je besser unser Verständnis über den komplexen Wirkungsbereich des AKT-Signalweges in der MSC-Chondrogenese ist, desto zielgerichteter können einzelne AKT-abhängige Differenzierungsaspekte während der MSC-Chondrogenese zu Gunsten einer chondralen MSC-Differenzierung kontrolliert werden. Indem hier zum ersten Mal aufgedeckt wurde, dass Induktion und Anstieg der AKT-Aktivierung notwendig für die Chondrozytendifferenzierung mit MSC war, leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag, MSC in Zukunft in einen nicht hypertrophen, AC-ähnlichen Phänotyp zu differenzieren und sie damit für die klinische Knorpelregeneration einsetzbar zu machen.

6 Zusammenfassung

Eine vielversprechende Zellquelle für das Tissue Engineering von Knorpelgewebe stellen mesenchymale Stromazellen (MSC) dar. Im Gegensatz zu artikulären Chondrozyten (AC) können MSC aus regenerierbaren Geweben wie Knochenmark isoliert werden ohne irreversible Schäden hervorzurufen. Bislang ist die Verwendung von MSC für die *In-vitro*-Knorpelneogenese allerdings durch ihre Differenzierung in einen hypertrophen Chondrozytenphänotyp limitiert, der aus der Wachstumsfuge bekannt ist und zu unerwünschter Knochenbildung führt. Um MSC zu einem AC-ähnlichen Phänotyp differenzieren zu können, müssen Signalwege identifiziert werden, die für diese enchondrale statt chondrale Fehldifferenzierung verantwortlich sein könnten. In diesem Kontext bisher nicht untersucht war der Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)/AKT-Signalweg, der in der Wachstumsfuge als pro-hypertropher Effektor an der Chondrozytenhypertrophie und Knochenbildung beteiligt ist. Obwohl AKT während der MSC-Chondrogenese *in vitro* durch die Behandlung mit Insulin kontinuierlich aktiviert wird, war bisher überraschenderweise nicht geklärt, ob der PI3K/AKT-Signalweg die enchondrale Differenzierung von MSC *in vitro* fördert. Das Ziel dieser Studie war es daher, die Funktion des PI3K/AKT-Signalweges für die MSC-Chondrogenese *in vitro* aufzuklären. Anfängliche Untersuchungen, ob enchondral differenzierende Zellen sensitiver auf AKT-Stimulierung reagierten als chondral differenzierende Zellen, ergaben eine deutliche Abhängigkeit der AKT-Aktivierung vom Differenzierungsstadium. Trotz identischer und konstanter exogener Stimuli starteten MSC mit niedrigerer AKT-Aktivierung in die Knorpelneogenese als AC, steigerten die AKT-Aktivierung bis zum Erreichen des Stadiums proliferierender Chondroblasten, woraufhin die pAKT-Spiegel in beiden Zelltypen mit voranschreitender Chondrozytenreife abnahmen. Im Einklang mit der beobachteten Klimax der pAKT-Spiegel in einer Phase intensiver Proliferation trug endogenes FGFR-Signaling zur AKT-Aktivierung bei, das für seine proliferative Funktion bekannt ist. Im Gegensatz dazu inhibierte das in supraphysiologischen Konzentrationen verwendete TGF β 1 eine potentiell übermäßige AKT-Aktivierung. Eine Erhöhung der initial niedrigen pAKT-Spiegel steigerte zwar geringfügig die Proteoglykanablagerung, reduzierte aber vor allem die Zellzahl pro Pellet, so dass die niedrige initiale AKT-Aktivierung in MSC für das anfängliche Zellüberleben beim Übergang zur serumfreien chondrogenen 3D-Kultur notwendig war. Zur Beantwortung der Frage, welche Funktion die erhöhte AKT-Aktivierung in der späten MSC-Chondrogenese erfüllt, zeigten Inhibitionsversuche, dass die PI3K/AKT-Signalwegaktivität für die Aufrechterhaltung des Chondrozytenphänotyps und für die Knorpelmatrixablagerung essentiell war. Zum ersten Mal beschrieb diese Studie für die *In-vitro*-Knorpelneogenese die Notwendigkeit von PI3K/AKT-Aktivierung für adäquates TGF β /SMAD2-Signaling und die SOX9-Proteinakkumulation und untermauerte die pro-chondrogene Rolle von AKT, die im Kontrast zu *In-vivo*-Knockout-Studien steht, wo der Verlust einzelner Signalwegkomponenten offensichtlich besser kompensiert werden kann. Im Gegensatz zur Wachstumsfuge war für die MSC-Chondrogenese keine pro-hypertrophe AKT-Funktion evident, was wahrscheinlich auf

die verwendete hohe Konzentration von anti-hypertroph wirkendem TGF β zurückzuführen war. Dass AKT-Aktivierung während der enchondralen MSC-Differenzierung die IBSP-Proteinspiegel reduzierte, deutete auf eine multifaktorielle AKT-Funktion für die MSC-Chondrogenese hin, die neben einer pro-chondrogenen und in Abwesenheit von TGF β pro-hypertrophen auch eine selektiv anti-osteogene Wirkung beinhalten könnte.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass MSC im Verlauf der Chondrogenese unter konstanter Stimulation je nach Differenzierungsstadium ein variables Maß an AKT-Aktivierung benötigen. Da eine frühe AKT-Überstimulation den Zellverlust verstärkt und späte PI3K/AKT-Inhibition die Knorpelneogenese beeinträchtigt, müssen Modulationen des PI3K/AKT-Signalweges sorgfältig auf den chondrogenen Differenzierungsgrad abgestimmt werden. Die hier erstmals belegte Relevanz der steigenden AKT-Aktivierung für die MSC-Chondrogenese ist wegweisend für das Knorpel-Tissue-Engineering, da zukünftige Versuche, die Chondrozytenhypertrophie *in vitro* zu reduzieren, darauf abgestimmt sein müssen, nach initial niedriger AKT-Aktivierung einen differenzierungsabhängigen Anstieg der AKT-Signalwegaktivität zu ermöglichen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit erweitern unser noch lückenhaftes Verständnis von PI3K/AKT-abhängigen Differenzierungsprozessen, die entscheidend für eine erfolgreiche Knorpelneogenese mit MSC sind. Somit leistet diese Studie einen wichtigen Beitrag, um MSC in einen AC-ähnlichen Chondrozytenphänotyp differenzieren zu können, der uneingeschränkt für die klinische Knorpelregeneration einsetzbar ist.

7 Literaturverzeichnis

- Abbaspour, A., Takata, S., Matsui, Y., Katoh, S., Takahashi, M. und Yasui, N. (2008). **Continuous infusion of insulin-like growth factor-I into the epiphysis of the tibia.** *Int Orthop* 32 (3), 395-402, doi: 10.1007/s00264-007-0336-7.
- Adepoju, A., Micali, N., Ogawa, K., Hoepfner, D. J. und McKay, R. D. (2014). **FGF2 and insulin signaling converge to regulate cyclin D expression in multipotent neural stem cells.** *Stem Cells* 32 (3), 770-778, doi: 10.1002/stem.1575.
- Ahmed, N., Lu, J., Brown, C. E., Taylor, D. W. und Kandel, R. A. (2014). **Serum- and growth-factor-free three-dimensional culture system supports cartilage tissue formation by promoting collagen synthesis via Sox9-Col2a1 interaction.** *Tissue Eng Part A* 20 (15-16), 2224-2233, doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0559.
- Ahrens, P. B., Solursh, M. und Reiter, R. S. (1977). **Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture.** *Dev Biol* 60 (1), 69-82, doi: 10.1016/0012-1606(77)90110-5.
- Archbold, H. C., Yang, Y. X., Chen, L. und Cadigan, K. M. (2012). **How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway.** *Acta Physiol (Oxf)* 204 (1), 74-109, doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02293.x.
- Ashton, B. A., Allen, T. D., Howlett, C., Eaglesom, C., Hattori, A. und Owen, M. (1980). **Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo.** *Clinical Orthopaedics and Related Research* 151, 294-307.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R. und Cohen, P. (2007). **The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update.** *Biochem J* 408 (3), 297-315, doi: 10.1042/bj20070797.
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J. und Efstratiadis, A. (1993). **Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth.** *Cell* 75 (1), 73-82.
- Baker, N., Sohn, J. und Tuan, R. S. (2015). **Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/Akt signaling, and the influence of caveolin-1/cholesterol homeostasis.** *Stem Cell Res Ther* 6, 238, doi: 10.1186/s13287-015-0225-8.
- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. und Arteaga, C. L. (2000). **Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration.** *J Biol Chem* 275 (47), 36803-36810, doi: 10.1074/jbc.M005912200.
- Balcerzak, M., Hamade, E., Zhang, L., Pikula, S., Azzar, G., Radisson, J., Bandorowicz-Pikula, J. und Buchet, R. (2003). **The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process.** *Acta Biochim Pol* 50 (4), 1019-1038.
- Ballard, F. J., Francis, G. L., Ross, M., Bagley, C. J., May, B. und Wallace, J. C. (1987). **Natural and synthetic forms of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and the potent derivative, destriptide IGF-1: biological activities and receptor binding.** *Biochem Biophys Res Commun* 149 (2), 398-404, doi: 10.1016/0006-291x(87)90380-9.
- Ballock, R. T., Heydemann, A., Wakefield, L. M., Flanders, K. C., Roberts, A. B. und Sporn, M. B. (1993). **TGF- β 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases.** *Dev Biol* 158 (2), 414-429.
- Behrens, P., Bitter, T., Kurz, B. und Russlies, M. (2006). **Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up.** *Knee* 13 (3), 194-202, doi: 10.1016/j.knee.2006.02.012.
- Benthien, J. P. und Behrens, P. (2010). **Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis (AMIC): Combining Microfracturing and a Collagen I/III Matrix for Articular Cartilage Resurfacing.** *Cartilage* 1 (1), 65-68, doi: 10.1177/1947603509360044.

- Benz, K., Breit, S., Lukoschek, M., Mau, H. und Richter, W. (2002). **Molecular analysis of expansion, differentiation, and growth factor treatment of human chondrocytes identifies differentiation markers and growth-related genes.** *Biochem Biophys Res Commun* 293 (1), 284-292, doi: 10.1016/s0006-291x(02)00223-1.
- Bhaskar, P. T. und Hay, N. (2007). **The Two TORCs and Akt.** *Dev Cell* 12 (4), 487-502, doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.020.
- Bhaumick, B. und Bala, R. M. (1991). **Differential effects of insulin-like growth factors I and II on growth, differentiation and glucoregulation in differentiating chondrocyte cells in culture.** *Acta Endocrinol (Copenh)* 125 (2), 201-211, doi: 10.1530/acta.0.1250201.
- Bhosale, A. M. und Richardson, J. B. (2008). **Articular cartilage: structure, injuries and review of management.** *Br Med Bull* 87, 77-95, doi: 10.1093/bmb/ldn025.
- Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. und de Crombrughe, B. (1999). **Sox9 is required for cartilage formation.** *Nat Genet* 22 (1), 85-89, doi: 10.1038/8792.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P. S., Mao, J. J., Robey, P. G., Simmons, P. J. und Wang, C. Y. (2013). **The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine.** *Nat Med* 19 (1), 35-42, doi: 10.1038/nm.3028.
- Bianco, P., Robey, P. G. und Simmons, P. J. (2008). **Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays.** *Cell Stem Cell* 2 (4), 313-319, doi: 10.1016/j.stem.2008.03.002.
- Binette, F., McQuaid, D. P., Haudenschild, D. R., Yaeger, P. C., McPherson, J. M. und Tubo, R. (1998). **Expression of a stable articular cartilage phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocytes in vitro.** *J Orthop Res* 16 (2), 207-216, doi: 10.1002/jor.1100160208.
- Biswas, S. K., Zhao, Y., Nagalingam, A., Gardner, T. W. und Sandirasegarane, L. (2008). **PDGF- and insulin/IGF-1-specific distinct modes of class IA PI 3-kinase activation in normal rat retinas and RGC-5 retinal ganglion cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 (8), 3687-3698, doi: 10.1167/iovs.07-1455.
- Boergermann, J. H., Kopf, J., Yu, P. B. und Knaus, P. (2010). **Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells.** *Int J Biochem Cell Biol* 42 (11), 1802-1807, doi: 10.1016/j.biocel.2010.07.018.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O. und Peterson, L. (1994). **Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.** *N Engl J Med* 331 (14), 889-895, doi: 10.1056/nejm199410063311401.
- Burke, T. W. und Vuk-Pavlović, S. (1993). **Insulin-like growth factor-I is a serum component stimulating growth of human neuroblastoma.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 29 (5), 391-394.
- Cao, X. und Chen, D. (2005). **The BMP signaling and in vivo bone formation.** *Gene* 357 (1), 1-8, doi: 10.1016/j.gene.2005.06.017.
- Capdevila, J. und Johnson, R. L. (1998). **Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning.** *Dev Biol* 197 (2), 205-217, doi: 10.1006/dbio.1997.8824.
- Caplan, A. I. (1991). **Mesenchymal stem cells.** *J Orthop Res* 9 (5), 641-650, doi: 10.1002/jor.1100090504.
- Caron, M. M., Emans, P. J., Coolen, M. M., Voss, L., Surtel, D. A., Cremers, A., van Rhijn, L. W. und Welting, T. J. (2012). **Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures.** *Osteoarthritis Cartilage* 20 (10), 1170-1178.

- Carpentier, J. L., Dayer, J. M., Lang, U., Silverman, R., Orci, L. und Gorden, P. (1984). **Down-regulation and recycling of insulin receptors. Effect of monensin on IM-9 lymphocytes and U-937 monocyte-like cells.** *J Biol Chem* 259 (22), 14190-14195.
- Chan, C. H., Jo, U., Kohrman, A., Rezaeian, A. H., Chou, P. C., Logothetis, C. und Lin, H. K. (2014). **Posttranslational regulation of Akt in human cancer.** *Cell Biosci* 4 (1), 59, doi: 10.1186/2045-3701-4-59.
- Chattopadhyay, T., Singh, R. R., Gupta, S. und Surolia, A. (2017). **Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) augments insulin sensitivity in mice with type II diabetes mellitus by potentiating PI3K/AKT pathway.** *Biofactors* 43 (2), 195-209, doi: 10.1002/biof.1334.
- Chaudhary, L. R. und Hruska, K. A. (2001). **The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic cells.** *J Cell Biochem* 81 (2), 304-311.
- Chavez, R. D., Coricor, G., Perez, J., Seo, H. S. und Serra, R. (2017). **SOX9 protein is stabilized by TGF- β and regulates PAPSS2 mRNA expression in chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 25 (2), 332-340, doi: 10.1016/j.joca.2016.10.007.
- Chen, J. C., Yang, S. T., Lin, C. Y., Hsu, C. J., Tsai, C. H., Su, J. L. und Tang, C. H. (2014). **BMP-7 enhances cell migration and $\alpha\beta$ 3 integrin expression via a c-Src-dependent pathway in human chondrosarcoma cells.** *PLoS One* 9 (11), e112636, doi: 10.1371/journal.pone.0112636.
- Cheng, C. C., Uchiyama, Y., Hiyama, A., Gajghate, S., Shapiro, I. M. und Risbud, M. V. (2009). **PI3K/AKT regulates aggrecan gene expression by modulating Sox9 expression and activity in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc.** *J Cell Physiol* 221 (3), 668-676, doi: 10.1002/jcp.21904.
- Cheng, J. Q., Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tsichlis, P. N. und Testa, J. R. (1992). **AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (19), 9267-9271, doi: 10.1073/pnas.89.19.9267.
- Cheng, L., Zhang, C., Li, D., Zou, J. und Wang, J. (2014). **Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces mouse precartilaginous stem cell proliferation through TGF-beta receptor II (TGFRII)-Akt-beta-catenin signaling.** *Int J Mol Sci* 15 (7), 12665-12676, doi: 10.3390/ijms150712665.
- Chew, N. J., Nguyen, E. V., Su, S. P., Novy, K., Chan, H. C., Nguyen, L. K., Luu, J., Simpson, K. J., Lee, R. S. und Daly, R. J. (2020). **FGFR3 signaling and function in triple negative breast cancer.** *Cell Commun Signal* 18 (1), 13, doi: 10.1186/s12964-019-0486-4.
- Chimal-Monroy, J. und De Leon, L. D. (2003). **Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilagel condensations.** *Int J Dev Biol* 43 (1), 59-67.
- Choukair, D., Hügel, U., Sander, A., Uhlmann, L. und Tönshoff, B. (2014). **Inhibition of IGF-I-related intracellular signaling pathways by proinflammatory cytokines in growth plate chondrocytes.** *Pediatr Res* 76 (3), 245-251, doi: 10.1038/pr.2014.84.
- Chubinskaya, S., Hakimiyani, A. A., Rappoport, L., Yanke, A., Rueger, D. C. und Cole, B. J. (2008). **Response of human chondrocytes prepared for autologous implantation to growth factors.** *J Knee Surg* 21 (3), 192-199, doi: 10.1055/s-0030-1247818.
- Ciarmatori, S., Kiepe, D., Haarmann, A., Huegel, U. und Tönshoff, B. (2007). **Signaling mechanisms leading to regulation of proliferation and differentiation of the mesenchymal chondrogenic cell line RCJ3.1C5.18 in response to IGF-I.** *J Mol Endocrinol* 38 (4), 493-508, doi: 10.1677/jme.1.02179.
- Cigan, A. D., Nims, R. J., Albro, M. B., Esau, J. D., Dreyer, M. P., Vunjak-Novakovic, G., Hung, C. T. und Ateshian, G. A. (2013). **Insulin, ascorbate, and glucose have a much greater influence than transferrin and selenous acid on the in vitro growth of engineered cartilage in**

- chondrogenic media.** *Tissue Eng Part A* 19 (17-18), 1941-1948, doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0596.
- Cohen, N. P., Foster, R. J. und Mow, V. C. (1998). **Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state.** *J Orthop Sports Phys Ther* 28 (4), 203-215.
- Cooper, K. L., Oh, S., Sung, Y., Dasari, R. R., Kirschner, M. W. und Tabin, C. J. (2013). **Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions.** *Nature* 495 (7441), 375-378, doi: 10.1038/nature11940.
- Coricor, G. und Serra, R. (2016). **TGF- β regulates phosphorylation and stabilization of Sox9 protein in chondrocytes through p38 and Smad dependent mechanisms.** *Sci Rep* 6, 38616, doi: 10.1038/srep38616.
- Correa, D., Somoza, R. A., Lin, P., Greenberg, S., Rom, E., Duesler, L., Welter, J. F., Yayon, A. und Caplan, A. I. (2015). **Sequential exposure to fibroblast growth factors (FGF) 2, 9 and 18 enhances hMSC chondrogenic differentiation.** *Osteoarthritis Cartilage* 23 (3), 443-453, doi: 10.1016/j.joca.2014.11.013.
- Crossley, P. H., Minowada, G., MacArthur, C. A. und Martin, G. R. (1996). **Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development.** *Cell* 84 (1), 127-136, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80999-x.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. und Nardi, N. B. (2006). **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** *J Cell Sci* 119 (Pt 11), 2204-2213, doi: 10.1242/jcs.02932.
- Danielpour, D. und Song, K. (2006). **Cross-talk between IGF-I and TGF-beta signaling pathways.** *Cytokine Growth Factor Rev* 17 (1-2), 59-74, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.007.
- Daopin, S., Piez, K. A., Ogawa, Y. und Davies, D. R. (1992). **Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily.** *Science* 257 (5068), 369-373, doi: 10.1126/science.1631557.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. und Cohen, P. (2000). **Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.** *Biochem J* 351 (Pt 1), 95-105, doi: 10.1042/0264-6021:3510095.
- Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L. und Yang, Y. (2005). **Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis.** *Dev Cell* 8 (5), 739-750, doi: 10.1016/j.devcel.2005.03.016.
- De Meyts, P., Ursø, B., Christoffersen, C. T. und Shymko, R. M. (1995). **Mechanism of insulin and IGF-I receptor activation and signal transduction specificity. Receptor dimer cross-linking, bell-shaped curves, and sustained versus transient signaling.** *Ann N Y Acad Sci* 766, 388-401, doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb26688.x.
- DeLise, A. M., Fischer, L. und Tuan, R. S. (2000). **Cellular interactions and signaling in cartilage development.** *Osteoarthritis Cartilage* 8 (5), 309-334, doi: 10.1053/joca.1999.0306.
- Deng, Y., Zhang, X., Li, R., Li, Z., Yang, B., Shi, P., Zhang, H., Wang, C., Wen, C., Li, G. und Bian, L. (2022). **Biomaterial-mediated presentation of wnt5a mimetic ligands enhances chondrogenesis and metabolism of stem cells by activating non-canonical Wnt signaling.** *Biomaterials* (1878-5905 (Electronic)).
- Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C. und Forbes, B. E. (2005). **Molecular interactions of the IGF system.** *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (4-5), 421-439, doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.004.
- Derfoul, A., Perkins, G. L., Hall, D. J. und Tuan, R. S. (2006). **Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of**

- cartilage extracellular matrix genes.** *Stem Cells* 24 (6), 1487-1495, doi: 10.1634/stemcells.2005-0415.
- Dexheimer, V., Frank, S. und Richter, W. (2012). **Proliferation as a Requirement for In Vitro Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells.** *Stem Cells Dev.*
- Dexheimer, V., Gabler, J., Bomans, K., Sims, T., Omlor, G. und Richter, W. (2016). **Differential expression of TGF- β superfamily members and role of Smad1/5/9-signalling in chondral versus endochondral chondrocyte differentiation.** *Sci Rep* 6, 36655, doi: 10.1038/srep36655.
- Diederichs, S., Tonniere, V., Marz, M., Dreher, S. I., Geisbusch, A. und Richter, W. (2019). **Regulation of WNT5A and WNT11 during MSC in vitro chondrogenesis: WNT inhibition lowers BMP and hedgehog activity, and reduces hypertrophy.** *Cell Mol Life Sci* 76 (19), 3875-3889, doi: 10.1007/s00018-019-03099-0.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. und Horwitz, E. (2006). **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 8 (4), 315-317, doi: 10.1080/14653240600855905.
- Dreher, S. I., Fischer, J., Walker, T., Diederichs, S. und Richter, W. (2020). **Significance of MEF2C and RUNX3 Regulation for Endochondral Differentiation of Human Mesenchymal Progenitor Cells.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 81, doi: 10.3389/fcell.2020.00081.
- Egawa, S., Miura, S., Yokoyama, H., Endo, T. und Tamura, K. (2014). **Growth and differentiation of a long bone in limb development, repair and regeneration.** *Dev Growth Differ* 56 (5), 410-424, doi: 10.1111/dgd.12136.
- Englinger, B., Kallus, S., Senkiv, J., Laemmerer, A., Moser, P., Gabler, L., Groza, D., Kowol, C. R., Heffeter, P., Grusch, M. und Berger, W. (2018). **Lysosomal Sequestration Impairs the Activity of the Preclinical FGFR Inhibitor PD173074.** *Cells* 7 (12), doi: 10.3390/cells7120259.
- Enomoto-Iwamoto, M., Kitagaki, J., Koyama, E., Tamamura, Y., Wu, C., Kanatani, N., Koike, T., Okada, H., Komori, T., Yoneda, T., Church, V., Francis-West, P. H., Kurisu, K., Nohno, T., Pacifici, M. und Iwamoto, M. (2002). **The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis.** *Dev Biol* 251 (1), 142-156, doi: 10.1006/dbio.2002.0802.
- Eyre, D. (1991). **The collagens of articular cartilage.** Beitrag präsentiert bei: *Semin Arthritis Rheum* (Elsevier).
- Fell, H. B. (1925). **THE HISTOGENESIS OF CARTILAGE AND BONE IN THE LONG BONES OF THE EMBRYONIC FOWL.** *J. Morphol. Physiol* 40, 417-459.
- Fernandez-Cancio, M., Esteban, C., Carrascosa, A., Toran, N., Andaluz, P. und Audi, L. (2008). **IGF-I and not IGF-II expression is regulated by glucocorticoids in human fetal epiphyseal chondrocytes.** *Growth Horm IGF Res* 18 (6), 497-505, doi: 10.1016/j.ghir.2008.04.004.
- Fischer, J., Aulmann, A., Dexheimer, V., Grossner, T. und Richter, W. (2014). **Intermittent PTHrP(1-34) exposure augments chondrogenesis and reduces hypertrophy of mesenchymal stromal cells.** *Stem Cells Dev* 23 (20), 2513-2523, doi: 10.1089/scd.2014.0101.
- Fischer, J., Dickhut, A., Rickert, M. und Richter, W. (2010). **Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis.** *Arthritis Rheum* 62 (9), 2696-2706, doi: 10.1002/art.27565.
- Fischer, J., Knoch, N., Sims, T., Rosshirt, N. und Richter, W. (2018). **Time-dependent contribution of BMP, FGF, IGF, and HH signaling to the proliferation of mesenchymal stroma cells during chondrogenesis.** *J Cell Physiol* 233 (11), 8962-8970, doi: 10.1002/jcp.26832.

- Fischer, J., Ortel, M., Hagmann, S., Hoeflich, A. und Richter, W. (2016). **Role of PTHrP(1-34) Pulse Frequency Versus Pulse Duration to Enhance Mesenchymal Stromal Cell Chondrogenesis**. *J Cell Physiol* 231 (12), 2673-2681, doi: 10.1002/jcp.25369.
- Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R. und Tschlis, P. N. (1995). **The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase**. *Cell* 81 (5), 727-736, doi: 10.1016/0092-8674(95)90534-0.
- Friedenstein, A. J. (1976). **Precursor cells of mechanocytes**. *Int Rev Cytol* 47, 327-359, doi: 10.1016/s0074-7696(08)60092-3.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. und Lalykina, K. S. (1970). **The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells**. *Cell Tissue Kinet* 3 (4), 393-403, doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.
- Frisch, J., Venkatesan, J. K., Rey-Rico, A., Schmitt, G., Madry, H. und Cucchiari, M. (2014). **Influence of insulin-like growth factor I overexpression via recombinant adeno-associated vector gene transfer upon the biological activities and differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells**. *Stem Cell Res Ther* 5 (4), 103, doi: 10.1186/scrt491.
- Fujita, T., Fukuyama, R., Enomoto, H. und Komori, T. (2004). **Dexamethasone inhibits insulin-induced chondrogenesis of ATDC5 cells by preventing PI3K-Akt signaling and DNA binding of Runx2**. *J Cell Biochem* 93 (2), 374-383, doi: 10.1002/jcb.20192.
- Fukai, A., Kawamura, N., Saito, T., Oshima, Y., Ikeda, T., Kugimiya, F., Higashikawa, A., Yano, F., Ogata, N., Nakamura, K., Chung, U. I. und Kawaguchi, H. (2010). **Akt1 in murine chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiologic and pathologic conditions**. *Arthritis Rheum* 62 (3), 826-836, doi: 10.1002/art.27296.
- Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y. und Asahara, H. (2005). **Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment**. *J Biol Chem* 280 (9), 8343-8350, doi: 10.1074/jbc.M413913200.
- Gans, C. und Northcutt, R. G. (1983). **Neural crest and the origin of vertebrates: a new head**. *Science* 220 (4594), 268-273.
- Ganss, B., Kim, R. H. und Sodek, J. (1999). **Bone sialoprotein**. *Crit Rev Oral Biol Med* 10 (1), 79-98, doi: 10.1177/10454411990100010401.
- Gelber, A. C., Hochberg, M. C., Mead, L. A., Wang, N. Y., Wigley, F. M. und Klag, M. J. (2000). **Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis**. *Ann Intern Med* 133 (5), 321-328, doi: 10.7326/0003-4819-133-5-200009050-00007.
- Gelse, K., Pöschl, E. und Aigner, T. (2003). **Collagens—structure, function, and biosynthesis**. *Advanced drug delivery reviews* 55 (12), 1531-1546.
- Gharbi, S. I., Zvelebil Mj Fau - Shuttleworth, S. J., Shuttleworth Sj Fau - Hancox, T., Hancox T Fau - Saghir, N., Saghir N Fau - Timms, J. F., Timms Jf Fau - Waterfield, M. D. und Waterfield, M. D. (2007). **Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002**. *Biochem J* (1470-8728 (Electronic)).
- Grottkau, B. E., Hui, Z. und Pang, Y. (2022). **Articular Cartilage Regeneration through Bioassembling Spherical Micro-Cartilage Building Blocks**. *Cells* 11 (20), doi: 10.3390/cells11203244.
- Gui, S., Yuan, G., Wang, L., Zhou, L., Xue, Y., Yu, Y., Zhang, J., Zhang, M., Yang, Y. und Wang, D. W. (2013). **Wnt3a regulates proliferation, apoptosis and function of pancreatic NIT-1 beta cells via activation of IRS2/PI3K signaling**. *J Cell Biochem* 114 (7), 1488-1497, doi: 10.1002/jcb.24490.

- Hadjidakis, D. J. und Androulakis, I. (2006). **Bone remodeling**. *Ann N Y Acad Sci* 1092, 385-396, doi: 10.1196/annals.1365.035.
- Hagmann, S., Moradi, B., Frank, S., Dreher, T., Kammerer, P. W., Richter, W. und Gotterbarm, T. (2013). **FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential**. *Cell Prolif* 46 (4), 396-407, doi: 10.1111/cpr.12046.
- Hallett, S. A., Ono, W. und Ono, N. (2019). **Growth Plate Chondrocytes: Skeletal Development, Growth and Beyond**. *Int J Mol Sci* 20 (23), doi: 10.3390/ijms20236009.
- Hanada, M., Feng, J. und Hemmings, B. A. (2004). **Structure, regulation and function of PKB/AKT-a major therapeutic target**. *Biochim Biophys Acta* 1697 (1-2), 3-16, doi: 10.1016/j.bbapap.2003.11.009.
- Hara, E. S., Ono, M., Yoshioka, Y., Ueda, J., Hazehara, Y., Pham, H. T., Matsumoto, T. und Kuboki, T. (2016). **Antagonistic Effects of Insulin and TGF-beta3 during Chondrogenic Differentiation of Human BMSCs under a Minimal Amount of Factors**. *Cells Tissues Organs* 201 (2), 88-96, doi: 10.1159/000442411.
- Hardingham, T. E. und Fosang, A. J. (1992). **Proteoglycans: many forms and many functions**. *The FASEB journal* 6 (3), 861-870.
- Harrell, C. R., Markovic, B. S., Fellbaum, C., Arsenijevic, A. und Volarevic, V. (2019). **Mesenchymal stem cell-based therapy of osteoarthritis: Current knowledge and future perspectives**. *Biomed Pharmacother* 109, 2318-2326, doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.099.
- Hata, A., Lagna, G., Massagué, J. und Hemmati-Brivanlou, A. (1998). **Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor**. *Genes Dev* 12 (2), 186-197, doi: 10.1101/gad.12.2.186.
- Heilig, J., Paulsson, M. und Zaucke, F. (2016). **Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) signaling regulates osterix expression and cartilage matrix mineralization during endochondral ossification**. *Bone* 83, 48-57, doi: 10.1016/j.bone.2015.10.007.
- Heldin, C. H. und Moustakas, A. (2016). **Signaling Receptors for TGF-β Family Members**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8 (8), doi: 10.1101/cshperspect.a022053.
- Hellingman, C. A., Davidson, E. N., Koevoet, W., Vitters, E. L., van den Berg, W. B., van Osch, G. J. und van der Kraan, P. M. (2011). **Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of Smad1/5/8P prevents terminal differentiation and calcification**. *Tissue Eng Part A* 17 (7-8), 1157-1167, doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0043.
- Hers, I., Vincent, E. E. und Tavaré, J. M. (2011). **Akt signalling in health and disease**. *Cell Signal* 23 (10), 1515-1527, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.05.004.
- Hinz, N. und Jücker, M. (2019). **Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review**. *Cell Commun Signal* 17 (1), 154, doi: 10.1186/s12964-019-0450-3.
- Huang, G., Chubinskaya, S., Liao, W. und Loeser, R. F. (2017). **Wnt5a induces catabolic signaling and matrix metalloproteinase production in human articular chondrocytes**. *Osteoarthritis Cartilage* 25 (9), 1505-1515, doi: 10.1016/j.joca.2017.05.018.
- Hung, I. H., Yu, K., Lavine, K. J. und Ornitz, D. M. (2007). **FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod**. *Dev Biol* 307 (2), 300-313, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.04.048.
- Hunter, G. K. und Goldberg, H. A. (1993). **Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (18), 8562-8565, doi: 10.1073/pnas.90.18.8562.

- Hunziker, E. B., Wagner, J. und Zapf, J. (1994). **Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo.** *J Clin Invest* 93 (3), 1078-1086, doi: 10.1172/jci117058.
- Ikegami, D., Akiyama, H., Suzuki, A., Nakamura, T., Nakano, T., Yoshikawa, H. und Tsumaki, N. (2011). **Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways.** *Development* 138 (8), 1507-1519, doi: 10.1242/dev.057802.
- Johnstone, B., Hering, T. M., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. und Yoo, J. U. (1998). **In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.** *Exp Cell Res* 238 (1), 265-272, doi: 10.1006/excr.1997.3858.
- Jones, S. M., Klinghoffer, R., Prestwich, G. D., Toker, A. und Kazlauskas, A. (1999). **PDGF induces an early and a late wave of PI 3-kinase activity, and only the late wave is required for progression through G1.** *Curr Biol* 9 (10), 512-521, doi: 10.1016/s0960-9822(99)80235-8.
- Kang, M. H., Oh, S. C., Lee, H. J., Kang, H. N., Kim, J. L., Kim, J. S. und Yoo, Y. A. (2011). **Metastatic function of BMP-2 in gastric cancer cells: the role of PI3K/AKT, MAPK, the NF-kappaB pathway, and MMP-9 expression.** *Exp Cell Res* 317 (12), 1746-1762, doi: 10.1016/j.yexcr.2011.04.006.
- Karp, S. J., Schipani, E., St-Jacques, B., Hunzelman, J., Kronenberg, H. und McMahon, A. P. (2000). **Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathways.** *Development* 127 (3), 543-548, doi: 10.1242/dev.127.3.543.
- Kato, Y., Iwamoto, M., Koike, T., Suzuki, F. und Takano, Y. (1988). **Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (24), 9552-9556, doi: 10.1073/pnas.85.24.9552.
- Katoh, M. und Nakagama, H. (2014). **FGF receptors: cancer biology and therapeutics.** *Med Res Rev* 34 (2), 280-300.
- Kaucka, M. und Adameyko, I. (2019). **Evolution and development of the cartilaginous skull: From a lancelet towards a human face.** *Semin Cell Dev Biol* 91, 2-12, doi: 10.1016/j.semcdb.2017.12.007.
- Khalil, N. (1999). **TGF-beta: from latent to active.** *Microbes Infect* 1 (15), 1255-1263, doi: 10.1016/s1286-4579(99)00259-2.
- Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J. und Yang, B. B. (2002). **Structure and function of aggrecan.** *Cell Res* 12 (1), 19-32, doi: 10.1038/sj.cr.7290106.
- Kim, S. E., Lee, W. J. und Choi, K. Y. (2007). **The PI3 kinase-Akt pathway mediates Wnt3a-induced proliferation.** *Cell Signal* 19 (3), 511-518, doi: 10.1016/j.cellsig.2006.08.008.
- Kimbrough-Allah, M. N., Millena, A. C. und Khan, S. A. (2018). **Differential role of PTEN in transforming growth factor β (TGF- β) effects on proliferation and migration in prostate cancer cells.** *Prostate* 78 (5), 377-389, doi: 10.1002/pros.23482.
- Kita, K., Kimura, T., Nakamura, N., Yoshikawa, H. und Nakano, T. (2008). **PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation.** *Genes Cells* 13 (8), 839-850, doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01209.x.
- Klampfleuthner, F. A. M., Lotz, B., Renkawitz, T., Richter, W. und Diederichs, S. (2022). **Stage-Dependent Activity and Pro-Chondrogenic Function of PI3K/AKT during Cartilage Neogenesis from Mesenchymal Stromal Cells.** *Cells* 11 (19), 2965.
- Kronenberg, H. M. (2003). **Developmental regulation of the growth plate.** *Nature* 423 (6937), 332-336, doi: 10.1038/nature01657.

- Kronenberg, H. M. (2007). **The role of the perichondrium in fetal bone development.** *Ann N Y Acad Sci* 1116, 59-64, doi: 10.1196/annals.1402.059.
- Kunkel, M. T., Ni, Q., Tsien, R. Y., Zhang, J. und Newton, A. C. (2005). **Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter.** *J Biol Chem* 280 (7), 5581-5587, doi: 10.1074/jbc.M411534200.
- Langer, R. und Vacanti, J. P. (1993). **Tissue engineering.** *Science* 260 (5110), 920-926, doi: 10.1126/science.8493529.
- Lau, M. T., So, W. K. und Leung, P. C. (2013). **Fibroblast growth factor 2 induces E-cadherin down-regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling in ovarian cancer cells.** *PLoS One* 8 (3), e59083, doi: 10.1371/journal.pone.0059083.
- Lazarus, J. E., Hegde, A., Andrade, A. C., Nilsson, O. und Baron, J. (2007). **Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate.** *Bone* 40 (3), 577-586, doi: 10.1016/j.bone.2006.10.013.
- Leach, R. M., Jr., Richards, M. P., Praul, C. A., Ford, B. C. und McMurtry, J. P. (2007). **Investigation of the insulin-like growth factor system in the avian epiphyseal growth plate.** *Domest Anim Endocrinol* 33 (2), 143-153, doi: 10.1016/j.domaniend.2006.04.010.
- Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., Hsu, H. P., Martin, S. D. und Spector, M. (2000). **Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee.** *J Orthop Res* 18 (5), 790-799, doi: 10.1002/jor.1100180517.
- Lee, J. Y., Kang, M. B., Jang, S. H., Qian, T., Kim, H. J., Kim, C. H., Kim, Y. und Kong, G. (2009a). **Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition.** *Oncogene* 28 (6), 824-831, doi: 10.1038/onc.2008.451.
- Lee, K., Lanske, B., Karaplis, A. C., Deeds, J. D., Kohno, H., Nissenson, R. A., Kronenberg, H. M. und Segre, G. V. (1996). **Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development.** *Endocrinology* 137 (11), 5109-5118, doi: 10.1210/endo.137.11.8895385.
- Lee, M. Y., Lim, H. W., Lee, S. H. und Han, H. J. (2009b). **Smad, PI3K/Akt, and Wnt-dependent signaling pathways are involved in BMP-4-induced ESC self-renewal.** *Stem Cells* 27 (8), 1858-1868, doi: 10.1002/stem.124.
- Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N. und de Crombrughe, B. (1997). **SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene.** *Mol Cell Biol* 17 (4), 2336-2346, doi: 10.1128/mcb.17.4.2336.
- Lefebvre, V. und Smits, P. (2005). **Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 75 (3), 200-212, doi: 10.1002/bdrc.20048.
- Leijten, J. C., Emons, J., Sticht, C., van Gool, S., Decker, E., Uitterlinden, A., Rappold, G., Hofman, A., Rivadeneira, F., Scherjon, S., Wit, J. M., van Meurs, J., van Blitterswijk, C. A. und Karperien, M. (2012). **Gremlin 1, frizzled-related protein, and Dkk-1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis.** *Arthritis Rheum* 64 (10), 3302-3312, doi: 10.1002/art.34535.
- Leonard, C. M., Fuld, H. M., Frenz, D. A., Downie, S. A., Massague, J. und Newman, S. A. (1991). **Role of transforming growth factor- β in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- β and evidence for endogenous TGF- β -like activity.** *Dev Biol* 145 (1), 99-109.
- LeRoith, D., Holly, J. M. P. und Forbes, B. E. (2021). **Insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors.** (2212-8778 (Electronic)).
- Lighten, A. D., Hardy, K., Winston, R. M. und Moore, G. E. (1997). **Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos.** *Mol*

- Reprod Dev 47 (2), 134-139, doi: 10.1002/(sici)1098-2795(199706)47:2<134::Aid-mrd2>3.0.Co;2-n.
- Lin, X., Zhang, Y., Liu, L., McKeehan, W. L., Shen, Y., Song, S. und Wang, F. (2011). **FRS2 α is essential for the fibroblast growth factor to regulate the mTOR pathway and autophagy in mouse embryonic fibroblasts.** *Int J Biol Sci* 7 (8), 1114-1121, doi: 10.7150/ijbs.7.1114.
- Liu, F., Kohlmeier, S. und Wang, C.-Y. (2008). **Wnt signaling and skeletal development.** *Cell Signal* 20 (6), 999-1009.
- Liu, J., Zhang, Y., Xu, R., Du, J., Hu, Z., Yang, L., Chen, Y., Zhu, Y. und Gu, L. (2013). **PI3K/Akt-dependent phosphorylation of GSK3 β and activation of RhoA regulate Wnt5a-induced gastric cancer cell migration.** *Cell Signal* 25 (2), 447-456.
- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. und Efstratiadis, A. (1993). **Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r).** *Cell* 75 (1), 59-72.
- Los, M., Maddika, S., Erb, B. und Schulze-Osthoff, K. (2009). **Switching Akt: from survival signaling to deadly response.** *Bioessays* 31 (5), 492-495, doi: 10.1002/bies.200900005.
- Louvi, A., Accili, D. und Efstratiadis, A. (1997). **Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development.** *Dev Biol* 189 (1), 33-48, doi: 10.1006/dbio.1997.8666.
- Lu, C., Wan, Y., Cao, J., Zhu, X., Yu, J., Zhou, R., Yao, Y., Zhang, L., Zhao, H., Li, H., Zhao, J., He, L., Ma, G., Yang, X., Yao, Z. und Guo, X. (2013). **Wnt-mediated reciprocal regulation between cartilage and bone development during endochondral ossification.** *Bone* 53 (2), 566-574, doi: 10.1016/j.bone.2012.12.016.
- Lu, G. M., Rong, Y. X., Liang, Z. J., Hunag, D. L., Wu, F. X., Ma, Y. F., Luo, Z. Z., Liu, X. H., Mo, S. und Li, H. M. (2020). **FGF2-induced PI3K/Akt signaling evokes greater proliferation and adipogenic differentiation of human adipose stem cells from breast than from abdomen or thigh.** *Aging (Albany NY)* 12 (14), 14830-14848, doi: 10.18632/aging.103547.
- Luo, K. (2017). **Signaling Cross Talk between TGF- β /Smad and Other Signaling Pathways.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9 (1), doi: 10.1101/cshperspect.a022137.
- Luyten, F. P., Hascall, V. C., Nissley, S. P., Morales, T. I. und Reddi, A. H. (1988). **Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants.** *Arch Biochem Biophys* 267 (2), 416-425, doi: 10.1016/0003-9861(88)90047-1.
- Mackay, A. M., Beck, S. C., Murphy, J. M., Barry, F. P., Chichester, C. O. und Pittenger, M. F. (1998). **Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow.** *Tissue Eng* 4 (4), 415-428, doi: 10.1089/ten.1998.4.415.
- Magne, D., Bluteau, G., Fauchoux, C., Palmer, G., Vignes-Colombeix, C., Pilet, P., Rouillon, T., Caverzasio, J., Weiss, P., Daculsi, G. und Guicheux, J. (2003). **Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification.** *J Bone Miner Res* 18 (8), 1430-1442, doi: 10.1359/jbmr.2003.18.8.1430.
- Mak, K. K., Kronenberg, H. M., Chuang, P. T., Mackem, S. und Yang, Y. (2008). **Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy.** *Development* 135 (11), 1947-1956, doi: 10.1242/dev.018044.
- Manning, B. D. und Cantley, L. C. (2007). **AKT/PKB signaling: navigating downstream.** *Cell* 129 (7), 1261-1274, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- Manning, B. D. und Toker, A. (2017). **AKT/PKB Signaling: Navigating the Network.** *Cell* 169 (3), 381-405, doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001.

- Maor, G., Hochberg, Z. und Silbermann, M. (1993). **Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles.** *Acta Endocrinol (Copenh)* 128 (1), 56-64, doi: 10.1530/acta.0.1280056.
- Martel-Pelletier, J., Barr, A. J., Cicuttini, F. M., Conaghan, P. G., Cooper, C., Goldring, M. B., Goldring, S. R., Jones, G., Teichtahl, A. J. und Pelletier, J. P. (2016). **Osteoarthritis.** *Nat Rev Dis Primers* 2, 16072, doi: 10.1038/nrdp.2016.72.
- Martelli, A. M., Tabellini, G., Bressanin, D., Ognibene, A., Goto, K., Cocco, L. und Evangelisti, C. (2012). **The emerging multiple roles of nuclear Akt.** *Biochim Biophys Acta* 1823 (12), 2168-2178, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.08.017.
- Masui, K., Tanaka, K., Ikegami, S., Villa, G. R., Yang, H., Yong, W. H., Cloughesy, T. F., Yamagata, K., Arai, N. und Cavenee, W. K. (2015). **Glucose-dependent acetylation of Rictor promotes targeted cancer therapy resistance.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (30), 9406-9411.
- Matsiko, A., Levingstone, T. J. und O'Brien, F. J. (2013). **Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair.** *Materials (Basel)* 6 (2), 637-668, doi: 10.3390/ma6020637.
- McQueeney, K. und Dealy, C. N. (2001). **Roles of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding protein-2 (IGFBP2) and -5 (IGFBP5) in developing chick limbs.** *Growth Horm IGF Res* 11 (6), 346-363, doi: 10.1054/ghir.2001.0250.
- Millán, J. L. (2013). **The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization.** *Calcif Tissue Int* 93 (4), 299-306, doi: 10.1007/s00223-012-9672-8.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M. und Vortkamp, A. (2002). **Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation.** *Dev Cell* 3 (3), 439-449, doi: 10.1016/s1534-5807(02)00261-7.
- Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P. und Vortkamp, A. (2001). **BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation.** *Development* 128 (22), 4523-4534.
- Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J. I., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J. L., Miyazono, K. und Sugamura, K. (2000). **Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA.** *Mol Cell Biol* 20 (24), 9346-9355, doi: 10.1128/mcb.20.24.9346-9355.2000.
- Moelling, K., Schad, K., Bosse, M., Zimmermann, S. und Schwenecker, M. (2002). **Regulation of Raf-Akt Cross-talk.** *J Biol Chem* 277 (34), 31099-31106, doi: 10.1074/jbc.M111974200.
- Mossahebi-Mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J.-S. und Li, X. (2020). **FGF signaling pathway: a key regulator of stem cell pluripotency.** *Frontiers in cell and developmental biology* 8, 79.
- Mushtaq, T., Bijman, P., Ahmed, S. F. und Farquharson, C. (2004). **Insulin-like growth factor-I augments chondrocyte hypertrophy and reverses glucocorticoid-mediated growth retardation in fetal mice metatarsal cultures.** *Endocrinology* 145 (5), 2478-2486, doi: 10.1210/en.2003-1435.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H. und ten Dijke, P. (1997). **Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling.** *Nature* 389 (6651), 631-635, doi: 10.1038/39369.
- Nakatani, K., Thompson, D. A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R. J. und Roth, R. A. (1999). **Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines.** *J Biol Chem* 274 (31), 21528-21532, doi: 10.1074/jbc.274.31.21528.
- Narcisi, R., Cleary, M. A., Brama, P. A., Hoogduijn, M. J., Tüysüz, N., ten Berge, D. und van Osch, G. J. (2015). **Long-term expansion, enhanced chondrogenic potential, and suppression of**

- endochondral ossification of adult human MSCs via WNT signaling modulation.** *Stem Cell Reports* 4 (3), 459-472, doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.017.
- Naski, M. C., Colvin, J. S., Coffin, J. D. und Ornitz, D. M. (1998). **Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3.** *Development* 125 (24), 4977-4988, doi: 10.1242/dev.125.24.4977.
- Nguyen, P. T., Tsunematsu, T., Yanagisawa, S., Kudo, Y., Miyauchi, M., Kamata, N. und Takata, T. (2013). **The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal-epithelial transition through the transcription factor AP-1.** *Br J Cancer* 109 (8), 2248-2258, doi: 10.1038/bjc.2013.550.
- Niehrs, C. (2012). **The complex world of WNT receptor signalling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (12), 767-779, doi: 10.1038/nrm3470.
- Noonan, K. J., Hunziker, E. B., Nessler, J. und Buckwalter, J. A. (1998). **Changes in cell, matrix compartment, and fibrillar collagen volumes between growth-plate zones.** *J Orthop Res* 16 (4), 500-508, doi: 10.1002/jor.1100160416.
- Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N. und Takada, S. (2002). **FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis.** *Genes Dev* 16 (7), 870-879, doi: 10.1101/gad.965702.
- Oliveira Silva, M., Gregory, J. L., Ansari, N. und Stok, K. S. (2020). **Molecular Signaling Interactions and Transport at the Osteochondral Interface: A Review.** *Front Cell Dev Biol* 8, 750, doi: 10.3389/fcell.2020.00750.
- Ortega, N., Behonick, D. J. und Werb, Z. (2004). **Matrix remodeling during endochondral ossification.** *Trends Cell Biol* 14 (2), 86-93, doi: 10.1016/j.tcb.2003.12.003.
- Osborn, K. D., Trippel, S. B. und Mankin, H. J. (1989). **Growth factor stimulation of adult articular cartilage.** *J Orthop Res* 7 (1), 35-42, doi: 10.1002/jor.1100070106.
- Owen, M. und Friedenstein, A. J. (1988). **Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.** *Ciba Found Symp* 136, 42-60, doi: 10.1002/9780470513637.ch4.
- Pampusch, M. S., Xi, G., Kamanga-Sollo, E., Loseth, K. J., Hathaway, M. R., Dayton, W. R. und White, M. E. (2005). **Production of recombinant porcine IGF-binding protein-5 and its effect on proliferation of porcine embryonic myoblast cultures in the presence and absence of IGF-I and Long-R3-IGF-I.** *J Endocrinol* 185 (1), 197-206, doi: 10.1677/joe.1.06037.
- Park, C. S., Schneider, I. C. und Haugh, J. M. (2003). **Kinetic analysis of platelet-derived growth factor receptor/phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling in fibroblasts.** *J Biol Chem* 278 (39), 37064-37072, doi: 10.1074/jbc.M304968200.
- Park, J., Gebhardt, M., Golovchenko, S., Perez-Branguli, F., Hattori, T., Hartmann, C., Zhou, X., deCrombrughe, B., Stock, M., Schneider, H. und von der Mark, K. (2015). **Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage.** *Biol Open* 4 (5), 608-621, doi: 10.1242/bio.201411031.
- Pelttari, K., Winter, A., Steck, E., Goetzke, K., Hennig, T., Ochs, B. G., Aigner, T. und Richter, W. (2006). **Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice.** *Arthritis Rheum* 54 (10), 3254-3266, doi: 10.1002/art.22136.
- Peng, X. D., Xu, P. Z., Chen, M. L., Hahn-Windgassen, A., Skeen, J., Jacobs, J., Sundararajan, D., Chen, W. S., Crawford, S. E., Coleman, K. G. und Hay, N. (2003). **Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2.** *Genes Dev* 17 (11), 1352-1365, doi: 10.1101/gad.1089403.

- Penke, L. R., Speth, J. M., Dommeti, V. L., White, E. S., Bergin, I. L. und Peters-Golden, M. (2018). **FOXM1 is a critical driver of lung fibroblast activation and fibrogenesis**. *J Clin Invest* 128 (6), 2389-2405, doi: 10.1172/jci87631.
- Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M. und Lindahl, A. (2003). **Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years**. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 2, 17-24, doi: 10.2106/00004623-200300002-00003.
- Peterson, L., Vasiliadis, H. S., Brittberg, M. und Lindahl, A. (2010). **Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up**. *Am J Sports Med* 38 (6), 1117-1124, doi: 10.1177/0363546509357915.
- Phornphutkul, C., Wu, K. Y., Auyeung, V., Chen, Q. und Gruppuso, P. A. (2008). **mTOR signaling contributes to chondrocyte differentiation**. *Dev Dyn* 237 (3), 702-712, doi: 10.1002/dvdy.21464.
- Phornphutkul, C., Wu, K. Y. und Gruppuso, P. A. (2006). **The role of insulin in chondrogenesis**. *Mol Cell Endocrinol* 249 (1-2), 107-115, doi: 10.1016/j.mce.2006.02.002.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. und Marshak, D. R. (1999). **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells**. *Science* 284 (5411), 143-147, doi: 10.1126/science.284.5411.143.
- Pizette, S. und Niswander, L. (2000). **BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes**. *Dev Biol* 219 (2), 237-249, doi: 10.1006/dbio.2000.9610.
- Pogue, R. und Lyons, K. (2006). **BMP signaling in the cartilage growth plate**. *Curr Top Dev Biol* 76, 1-48, doi: 10.1016/s0070-2153(06)76001-x.
- Pridie, K. (1959). **A method of resurfacing osteoarthritic knee joints**. *J Bone Joint Surg Br* 41, 618-619.
- Puetzer, J. L., Petite, J. N. und Lobo, E. G. (2010). **Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue**. *Tissue Eng Part B Rev* 16 (4), 435-444, doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0705.
- Qian, X., Anzovino, A., Kim, S., Suyama, K., Yao, J., Hulit, J., Agiostratidou, G., Chandiramani, N., McDaid, H. M., Nagi, C., Cohen, H. W., Phillips, G. R., Norton, L. und Hazan, R. B. (2014). **N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties**. *Oncogene* 33 (26), 3411-3421, doi: 10.1038/onc.2013.310.
- Quan, M. Y., Guo, Q., Liu, J., Yang, R., Bai, J., Wang, W., Cai, Y., Han, R., Lv, Y. Q., Ding, L., Billadeau, D. D., Lou, Z., Bellusci, S., Li, X. und Zhang, J. S. (2020). **An FGFR/AKT/SOX2 Signaling Axis Controls Pancreatic Cancer Stemness**. *Front Cell Dev Biol* 8, 287, doi: 10.3389/fcell.2020.00287.
- Qureshi, H. Y., Ahmad, R., Sylvester, J. und Zafarullah, M. (2007). **Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-beta in human chondrocytes**. *Cell Signal* 19 (8), 1643-1651, doi: 10.1016/j.cellsig.2007.02.007.
- Rabenberg, M. (2013). **Themenheft 54" Arthrose"**.
- Railo, A., Nagy, I., Kilpeläinen, P. und Vainio, S. (2008). **Wnt-11 signaling leads to down-regulation of the Wnt/beta-catenin, JNK/AP-1 and NF-kappaB pathways and promotes viability in the CHO-K1 cells**. *Exp Cell Res* 314 (13), 2389-2399, doi: 10.1016/j.yexcr.2008.04.010.
- Romashkova, J. A. und Makarov, S. S. (1999). **NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling**. *Nature* 401 (6748), 86-90, doi: 10.1038/43474.

- Rommel, C., Clarke, B. A., Zimmermann, S., Nuñez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G. D. und Glass, D. J. (1999). **Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt.** *Science* 286 (5445), 1738-1741, doi: 10.1126/science.286.5445.1738.
- Roughley, P. J. und Lee, E. R. (1994). **Cartilage proteoglycans: structure and potential functions.** *Microsc Res Tech* 28 (5), 385-397.
- Ryu, J. M., Lee, M. Y., Yun, S. P. und Han, H. J. (2010). **High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF-beta1 expression via Ca2+/PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways.** *J Cell Physiol* 224 (1), 59-70, doi: 10.1002/jcp.22091.
- Sanchez-Duffhues, G., Williams, E., Goumans, M. J., Heldin, C. H. und Ten Dijke, P. (2020). **Bone morphogenetic protein receptors: Structure, function and targeting by selective small molecule kinase inhibitors.** *Bone* 138, 115472, doi: 10.1016/j.bone.2020.115472.
- Schmid, T. M. und Linsenmayer, T. F. (1985). **Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues.** *J Cell Biol* 100 (2), 598-605, doi: 10.1083/jcb.100.2.598.
- Scioli, M. G., Cervelli, V., Arcuri, G., Gentile, P., Doldo, E., Bielli, A., Bonanno, E. und Orlandi, A. (2014). **High insulin-induced down-regulation of Erk-1/IGF-1R/FGFR-1 signaling is required for oxidative stress-mediated apoptosis of adipose-derived stem cells.** *J Cell Physiol* 229 (12), 2077-2087, doi: 10.1002/jcp.24667.
- Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A. und Noda, M. (2000). **SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6.** *J Biol Chem* 275 (15), 10738-10744, doi: 10.1074/jbc.275.15.10738.
- Sekiya, I., Vuoristo, J. T., Larson, B. L. und Prockop, D. J. (2002). **In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (7), 4397-4402, doi: 10.1073/pnas.052716199.
- Shen, G. (2005). **The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage.** *Orthod Craniofac Res* 8 (1), 11-17.
- Shiomi, T., Lemaître, V., D'Armiento, J. und Okada, Y. (2010). **Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases.** *Pathol Int* 60 (7), 477-496, doi: 10.1111/j.1440-1827.2010.02547.x.
- Silvestrini, G., Mocetti, P., Ballanti, P., Di Grezia, R. und Bonucci, E. (1998). **In vivo incidence of apoptosis evaluated with the TdT FragEL DNA fragmentation detection kit in cartilage and bone cells of the rat tibia.** *Tissue Cell* 30 (6), 627-633, doi: 10.1016/s0040-8166(98)80081-5.
- Solheim, E., Hegna, J., Strand, T., Harlem, T. und Inderhaug, E. (2018). **Randomized study of long-term (15-17 years) outcome after microfracture versus mosaicplasty in knee articular cartilage defects.** *The American journal of sports medicine* 46 (4), 826-831.
- Solursh, M. und Reiter, R. S. (1975). **Determination of limb bud chondrocytes during a transient block of the cell cycle.** *Cell Differ* 4 (3), 131-137, doi: 10.1016/0045-6039(75)90034-2.
- Sonderegger, S., Haslinger, P., Sabri, A., Leisser, C., Otten, J. V., Fiala, C. und Knöfler, M. (2010). **Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation.** *Endocrinology* 151 (1), 211-220, doi: 10.1210/en.2009-0557.
- Song, K., Cornelius, S. C., Reiss, M. und Danielpour, D. (2003). **Insulin-like growth factor-I inhibits transcriptional responses of transforming growth factor-beta by phosphatidylinositol 3-**

- kinase/Akt-dependent suppression of the activation of Smad3 but not Smad2.** *J Biol Chem* 278 (40), 38342-38351, doi: 10.1074/jbc.M304583200.
- Sophia Fox, A. J., Bedi, A. und Rodeo, S. A. (2009). **The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function.** *Sports Health* 1 (6), 461-468, doi: 10.1177/1941738109350438.
- Staal, S. P., Hartley, J. W. und Rowe, W. P. (1977). **Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (7), 3065-3067, doi: 10.1073/pnas.74.7.3065.
- Staal, S. P., Huebner, K., Croce, C. M., Parsa, N. Z. und Testa, J. R. (1988). **The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32.** *Genomics* 2 (1), 96-98, doi: 10.1016/0888-7543(88)90114-0.
- Starkman, B. G., Cravero, J. D., Delcarlo, M. und Loeser, R. F. (2005). **IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK.** *Biochem J* 389 (Pt 3), 723-729, doi: 10.1042/bj20041636.
- Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Briggs, K. K. und Rodrigo, J. J. (1999). **[The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint].** *Orthopade* 28 (1), 26-32, doi: 10.1007/s001320050318.
- Steele-Perkins, G., Turner, J., Edman, J. C., Hari, J., Pierce, S. B., Stover, C., Rutter, W. J. und Roth, R. A. (1988). **Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor.** *J Biol Chem* 263 (23), 11486-11492.
- Steinert, A. F., Palmer, G. D., Pilapil, C., Nöth, U., Evans, C. H. und Ghivizzani, S. C. (2009). **Enhanced in vitro chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer.** *Tissue Eng Part A* 15 (5), 1127-1139, doi: 10.1089/ten.tea.2007.0252.
- Stockwell, R. (1967). **The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage.** *J Anat* 109 (Pt 3), 411.
- Studer, D., Millan, C., Öztürk, E., Maniura-Weber, K. und Zenobi-Wong, M. (2012). **Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells.** *Eur Cell Mater* 24, 118-135; discussion 135, doi: 10.22203/ecm.v024a09.
- Su, N., Jin, M. und Chen, L. (2014). **Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: learning from mouse models.** *Bone Res* 2, 14003, doi: 10.1038/boneres.2014.3.
- Sundaresan, N. R., Pillai, V. B., Wolfgeher, D., Samant, S., Vasudevan, P., Parekh, V., Raghuraman, H., Cunningham, J. M., Gupta, M. und Gupta, M. P. (2011). **The deacetylase SIRT1 promotes membrane localization and activation of Akt and PDK1 during tumorigenesis and cardiac hypertrophy.** *Sci Signal* 4 (182), ra46, doi: 10.1126/scisignal.2001465.
- Takegami, Y., Ohkawara, B., Ito, M., Masuda, A., Nakashima, H., Ishiguro, N. und Ohno, K. (2016). **R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/ β -catenin signaling in endochondral ossification.** *Biochem Biophys Res Commun* 473 (1), 255-264, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.089.
- Tan, S. X., Ng, Y., Meoli, C. C., Kumar, A., Khoo, P. S., Fazakerley, D. J., Junutula, J. R., Vali, S., James, D. E. und Stöckli, J. (2012). **Amplification and demultiplexing in insulin-regulated Akt protein kinase pathway in adipocytes.** *J Biol Chem* 287 (9), 6128-6138, doi: 10.1074/jbc.M111.318238.
- Temenoff, J. S. und Mikos, A. G. (2000). **Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage.** *Biomaterials* 21 (5), 431-440, doi: 10.1016/s0142-9612(99)00213-6.
- Ten Dijke, P. und Arthur, H. M. (2007). **Extracellular control of TGF β signalling in vascular development and disease.** *Nature reviews Molecular cell biology* 8 (11), 857-869.

- Thielen, N. G. M., van der Kraan, P. M. und van Caam, A. P. M. (2019). **TGF β /BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis**. *Cells* 8 (9), doi: 10.3390/cells8090969.
- Thien, A., Prentzell, M. T., Holzwarth, B., Kläsener, K., Kuper, I., Boehlke, C., Sonntag, A. G., Ruf, S., Maerz, L., Nitschke, R., Grellscheid, S. N., Reth, M., Walz, G., Baumeister, R., Neumann-Haefelin, E. und Thedieck, K. (2015). **TSC1 activates TGF- β -Smad2/3 signaling in growth arrest and epithelial-to-mesenchymal transition**. *Dev Cell* 32 (5), 617-630, doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.026.
- Thobe, K., Sers, C. und Siebert, H. (2017). **Unraveling the regulation of mTORC2 using logical modeling**. *Cell Commun Signal* 15 (1), 6, doi: 10.1186/s12964-016-0159-5.
- Tins, B. J., McCall, I. W., Takahashi, T., Cassar-Pullicino, V., Roberts, S., Ashton, B. und Richardson, J. (2005). **Autologous chondrocyte implantation in knee joint: MR imaging and histologic features at 1-year follow-up**. *Radiology* 234 (2), 501-508, doi: 10.1148/radiol.2342031970.
- Trendelenburg, A. U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S. und Glass, D. J. (2009). **Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size**. *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (6), C1258-1270, doi: 10.1152/ajpcell.00105.2009.
- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L. und Wrana, J. L. (1998). **SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor**. *Cell* 95 (6), 779-791, doi: 10.1016/s0092-8674(00)81701-8.
- Turner, N. und Grose, R. (2010). **Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer**. *Nat Rev Cancer* 10 (2), 116-129, doi: 10.1038/nrc2780.
- Tzavlaki, K. und Moustakas, A. (2020). **TGF- β Signaling**. *Biomolecules* 10 (3), doi: 10.3390/biom10030487.
- Ulici, V., Hoenselaar, K. D., Agoston, H., McErlain, D. D., Umoh, J., Chakrabarti, S., Holdsworth, D. W. und Beier, F. (2009). **The role of Akt1 in terminal stages of endochondral bone formation: angiogenesis and ossification**. *Bone* 45 (6), 1133-1145, doi: 10.1016/j.bone.2009.08.003.
- Umansky, R. (1966). **The effect of cell population density on the developmental fate of reaggregating mouse limb bud mesenchyme**. *Dev Biol* 13 (1), 31-56, doi: 10.1016/0012-1606(66)90048-0.
- Usami, Y., Gunawardena, A. T., Iwamoto, M. und Enomoto-Iwamoto, M. (2016). **Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies**. *Lab Invest* 96 (2), 186-196, doi: 10.1038/labinvest.2015.142.
- Vacanti, C. A., Langer, R., Schloo, B. und Vacanti, J. P. (1991). **Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation**. *Plast Reconstr Surg* 88 (5), 753-759, doi: 10.1097/00006534-199111000-00001.
- Valacca, C., Tassone, E. und Mignatti, P. (2015). **TIMP-2 Interaction with MT1-MMP Activates the AKT Pathway and Protects Tumor Cells from Apoptosis**. *PLoS One* 10 (9), e0136797, doi: 10.1371/journal.pone.0136797.
- Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E.-H., Krystal, G., Ali, S. und Lebrun, J.-J. (2002). **Activin/TGF- β induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP**. *Nat Cell Biol* 4 (12), 963-969.
- van Kleffens, M., Groffen, C., Rosato, R. R., van den Eijnde, S. M., van Neck, J. W., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Zwarthoff, E. C. und Drop, S. L. (1998). **mRNA expression patterns of the IGF system during mouse limb bud development, determined by whole mount in situ hybridization**. *Mol Cell Endocrinol* 138 (1-2), 151-161, doi: 10.1016/s0303-7207(98)00007-0.

- Vlahos, C. J., Matter Wf Fau - Hui, K. Y., Hui Ky Fau - Brown, R. F. und Brown, R. F. (1994). **A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)**. *J Biol Chem* (0021-9258 (Print)).
- Volz, M., Schaumburger, J., Frick, H., Grifka, J. und Anders, S. (2017). **A randomized controlled trial demonstrating sustained benefit of Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis over microfracture at five years**. *Int Orthop* 41 (4), 797-804, doi: 10.1007/s00264-016-3391-0.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. und Tabin, C. J. (1996). **Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein**. *Science* 273 (5275), 613-622, doi: 10.1126/science.273.5275.613.
- Walker, E. H., Pacold Me Fau - Perisic, O., Perisic O Fau - Stephens, L., Stephens L Fau - Hawkins, P. T., Hawkins Pt Fau - Wymann, M. P., Wymann Mp Fau - Williams, R. L. und Williams, R. L. (2000). **Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine**. *Mol Cell* (1097-2765 (Print)).
- Walker, K. S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P. und Alessi, D. R. (1998). **Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha**. *Biochem J* 331 (Pt 1) (Pt 1), 299-308, doi: 10.1042/bj3310299.
- Walker, L., Millena, A. C., Strong, N. und Khan, S. A. (2013). **Expression of TGFβ3 and its effects on migratory and invasive behavior of prostate cancer cells: involvement of PI3-kinase/AKT signaling pathway**. *Clin Exp Metastasis* 30 (1), 13-23, doi: 10.1007/s10585-012-9494-0.
- Wang, E., Wang, J., Chin, E., Zhou, J. und Bondy, C. A. (1995). **Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis**. *Endocrinology* 136 (6), 2741-2751, doi: 10.1210/endo.136.6.7750499.
- Wang, J., Zhou, J. und Bondy, C. A. (1999). **Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy**. *FASEB J* 13 (14), 1985-1990, doi: 10.1096/fasebj.13.14.1985.
- Wang, S., Huang, X., Sun, D., Xin, X., Pan, Q., Peng, S., Liang, Z., Luo, C., Yang, Y., Jiang, H., Huang, M., Chai, W., Ding, J. und Geng, M. (2012). **Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling**. *PLoS One* 7 (5), e37427, doi: 10.1371/journal.pone.0037427.
- Wang, W., Chun, H., Baek, J., Sadik, J. E., Shirazyan, A., Razavi, P., Lopez, N. und Lyons, K. M. (2019). **The TGFβ type I receptor TGFβRI functions as an inhibitor of BMP signaling in cartilage**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116 (31), 15570-15579, doi: 10.1073/pnas.1902927116.
- Wang, W., Song, B., Anbarchian, T., Shirazyan, A., Sadik, J. E. und Lyons, K. M. (2016). **Smad2 and Smad3 Regulate Chondrocyte Proliferation and Differentiation in the Growth Plate**. *PLoS Genet* 12 (10), e1006352, doi: 10.1371/journal.pgen.1006352.
- Wang, Y., Cheng, Z., Elalieh, H. Z., Nakamura, E., Nguyen, M. T., Mackem, S., Clemens, T. L., Bikle, D. D. und Chang, W. (2011). **IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/lhh pathway**. *J Bone Miner Res* 26 (7), 1437-1446, doi: 10.1002/jbmr.359.
- Wang, Y., Nishida, S., Sakata, T., Elalieh, H. Z., Chang, W., Halloran, B. P., Doty, S. B. und Bikle, D. D. (2006). **Insulin-like growth factor-I is essential for embryonic bone development**. *Endocrinology* 147 (10), 4753-4761, doi: 10.1210/en.2006-0196.
- Watson, A. J., Hogan, A., Hahnel, A., Wiemer, K. E. und Schultz, G. A. (1992). **Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo**. *Mol Reprod Dev* 31 (2), 87-95, doi: 10.1002/mrd.1080310202.
- Watson, A. J., Watson, P. H., Arcellana-Panlilio, M., Warnes, D., Walker, S. K., Schultz, G. A., Armstrong, D. T. und Seamark, R. F. (1994). **A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development**. *Biol Reprod* 50 (4), 725-733, doi: 10.1095/biolreprod50.4.725.

- Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E. und Richter, W. (2010). **Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells**. *J Cell Physiol* 223 (1), 84-93, doi: 10.1002/jcp.22013.
- Winter, A., Breit, S., Parsch, D., Benz, K., Steck, E., Hauner, H., Weber, R. M., Ewerbeck, V. und Richter, W. (2003). **Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells**. *Arthritis Rheum* 48 (2), 418-429, doi: 10.1002/art.10767.
- Xi, G., Hathaway, M. R., White, M. E. und Dayton, W. R. (2007). **Localization of insulin-like growth factor (IGFBP)-3 in cultured porcine embryonic myogenic cells before and after TGF-beta1 treatment**. *Domest Anim Endocrinol* 33 (4), 422-429, doi: 10.1016/j.domaniend.2006.08.006.
- Xia, P., Gu, R., Zhang, W., Shao, L., Li, F., Wu, C. und Sun, Y. (2019). **MicroRNA-200c promotes osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells through activating the AKT/beta-Catenin signaling pathway via downregulating Myd88**. *J Cell Physiol* 234 (12), 22675-22686, doi: 10.1002/jcp.28834.
- Xie, Y., Su, N., Yang, J., Tan, Q., Huang, S., Jin, M., Ni, Z., Zhang, B., Zhang, D., Luo, F., Chen, H., Sun, X., Feng, J. Q., Qi, H. und Chen, L. (2020). **FGF/FGFR signaling in health and disease**. *Signal Transduct Target Ther* 5 (1), 181, doi: 10.1038/s41392-020-00222-7.
- Xue, G., Restuccia, D. F., Lan, Q., Hynx, D., Dirnhofer, S., Hess, D., Ruegg, C. und Hemmings, B. A. (2012). **Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF-beta signaling axes**. *Cancer Discov* 2 (3), 248-259, doi: 10.1158/2159-8290.Cd-11-0270.
- Yaeger, P. C., Masi, T. L., de Ortiz, J. L., Binette, F., Tubo, R. und McPherson, J. M. (1997). **Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes**. *Exp Cell Res* 237 (2), 318-325, doi: 10.1006/excr.1997.3781.
- Yang, G., Zhu, L., Hou, N., Lan, Y., Wu, X. M., Zhou, B., Teng, Y. und Yang, X. (2014a). **Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes**. *Cell Res* 24 (10), 1266-1269, doi: 10.1038/cr.2014.111.
- Yang, L., Tsang, K. Y., Tang, H. C., Chan, D. und Cheah, K. S. (2014b). **Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (33), 12097-12102, doi: 10.1073/pnas.1302703111.
- Yang, X., Chen, L., Xu, X., Li, C., Huang, C. und Deng, C. X. (2001). **TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage**. *J Cell Biol* 153 (1), 35-46, doi: 10.1083/jcb.153.1.35.
- Yao, X., Zhang, J., Jing, X., Ye, Y., Guo, J., Sun, K. und Guo, F. (2019). **Fibroblast growth factor 18 exerts anti-osteoarthritic effects through PI3K-AKT signaling and mitochondrial fusion and fission**. *Pharmacol Res* 139, 314-324, doi: 10.1016/j.phrs.2018.09.026.
- Ye, C., Zhang, W., Hang, K., Chen, M., Hou, W., Chen, J., Chen, X., Chen, E., Tang, L., Lu, J., Ding, Q., Jiang, G., Hong, B. und He, R. (2019). **Extracellular IL-37 promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via activation of the PI3K/AKT signaling pathway**. *Cell Death Dis* 10 (10), 753, doi: 10.1038/s41419-019-1904-7.
- Yin, W., Park, J. I. und Loeser, R. F. (2009). **Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signaling pathways**. *J Biol Chem* 284 (46), 31972-31981, doi: 10.1074/jbc.M109.056838.
- Yoo, J. U., Barthel, T. S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A. I., Goldberg, V. M. und Johnstone, B. (1998). **The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells**. *J Bone Joint Surg Am* 80 (12), 1745-1757, doi: 10.2106/00004623-199812000-00004.

- Yoon, B. S., Ovchinnikov, D. A., Yoshii, I., Mishina, Y., Behringer, R. R. und Lyons, K. M. (2005). **Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (14), 5062-5067, doi: 10.1073/pnas.0500031102.
- Zenmyo, M., Komiya, S., Kawabata, R., Sasaguri, Y., Inoue, A. und Morimatsu, M. (1996). **Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate**. *J Pathol* 180 (4), 430-433, doi: 10.1002/(sici)1096-9896(199612)180:4<430::Aid-path691>3.0.Co;2-h.
- Zhang, F., He, Q., Tsang, W. P., Garvey, W. T., Chan, W. Y. und Wan, C. (2014). **Insulin exerts direct, IGF-1 independent actions in growth plate chondrocytes**. *Bone Res* 2, 14012, doi: 10.1038/boneres.2014.12.
- Zhang, J., Liu, X., Li, H., Chen, C., Hu, B., Niu, X., Li, Q., Zhao, B., Xie, Z. und Wang, Y. (2016). **Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway**. *Stem Cell Res Ther* 7 (1), 136, doi: 10.1186/s13287-016-0391-3.
- Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B. E., Micanin, C., Huang, H., Sheppard, K. A., Porter, J. A., Lu, C. X. und ten Dijke, P. (2012). **USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor**. *Nat Cell Biol* 14 (7), 717-726, doi: 10.1038/ncb2522.
- Zhang, X., Kidder, G. M., Watson, A. J., Schultz, G. A. und Armstrong, D. T. (1994). **Possible roles of insulin and insulin-like growth factors in rat preimplantation development: investigation of gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction**. *J Reprod Fertil* 100 (2), 375-380, doi: 10.1530/jrf.0.1000375.
- Zhao, D., Jiang, M., Zhang, X. und Hou, H. (2020). **The role of RICTOR amplification in targeted therapy and drug resistance**. *Mol Med* 26 (1), 20, doi: 10.1186/s10020-020-0146-6.
- Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H. und de Crombrughe, B. (2014). **Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice**. *PLoS Genet* 10 (12), e1004820, doi: 10.1371/journal.pgen.1004820.
- Zou, L., Cao, S., Kang, N., Huebert, R. C. und Shah, V. H. (2012). **Fibronectin induces endothelial cell migration through β 1 integrin and Src-dependent phosphorylation of fibroblast growth factor receptor-1 at tyrosines 653/654 and 766**. *J Biol Chem* 287 (10), 7190-7202, doi: 10.1074/jbc.M111.304972.

Eigenanteil an Datenerhebung und -auswertung

Diese Arbeit wurde fast ausschließlich von mir selbst durchgeführt. Die globale Transkriptomanalyse, die für Tabelle 1 ausgewertet wurde, wurde durch Verena Dexheimer angewiesen und am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg durchgeführt. Zellkulturarbeiten, Herstellung der Proteinlysate und die Durchführung der in Abbildung 22B und 22C gezeigten Westernblots erfolgte durch Simon Dreher. Die weitere Bearbeitung der Membranen für die Detektion von pAKT- und AKT-Protein erfolgte durch mich. Um die experimentellen Arbeiten für die aus dieser Doktorarbeit entstandene Publikation zügig abzuschließen wurden für die Abbildungen 20, 21 und 23 Teile der Zellkulturarbeiten von Carina Binder bzw. Kollagen-Typ-II-Färbungen von Barbara König durchgeführt. Die Planung der Zellkulturarbeiten und sämtliche Schritte der experimentellen Analytik bzw. die Zusammenstellung und Auswertung der Kollagen-Typ-II-Färbungen erfolgten durch mich. Diese Daten wurden in keiner anderen Doktorarbeit verwendet.

Eigene Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Während der Promotion entstandene Veröffentlichungen

Klampfleuthner, F. A. M., Lotz, B., Renkawitz, T., Richter, W., & Diederichs, S. (2022). *Stage-Dependent Activity and Pro-Chondrogenic Function of PI3K/AKT during Cartilage Neogenesis from Mesenchymal Stromal Cells*. *Cells*, 11(19), 2965. <https://doi.org/10.3390/cells11192965>.

Impact-Faktor (2021): 7,66

Diese Publikation entstand im Rahmen meiner Dissertation und umfasst die in Kapitel 3.5 und 3.6 entsprechend gekennzeichneten Teile. Einige Teilabbildungen der Publikation wurden in der hier vorliegenden Dissertation verwendet. Auch Aspekte von Einleitung und Diskussion, die in stark verkürzter Form in diese Publikation eingeflossen sind, wurden in der vorliegenden Arbeit weiter ausgeführt. Mein Eigenanteil an der Publikation erstreckt sich auf die Versuchsplanung, Datenerhebung und -auswertung, Erstellung der Abbildungen und das Aufsetzen der initialen Manuskriptversion sowie Überarbeitung des Originals in die finale Form. Über die Urheberrechte der Publikation verfügen laut Internetauftritt der *MDPI Open Access Journals*, denen *Cells* angehört³, die Autoren der Studie. Lizenznehmer ist MDPI, Basel, Schweiz.

Diederichs, S., **Klampfleuthner, F. A. M.**, Moradi, B., & Richter, W. (2019). *Chondral Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Without Progression Into the Endochondral Pathway*. *Front Cell Dev Biol*, 7, 270. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00270>.

Vor der Promotion entstandene Veröffentlichungen

Czaczkas, T. J., Salmane, A. K., **Klampfleuthner, F. A. M.**, & Heinze, J. (2016). *Private information alone can trigger trapping of ant colonies in local feeding optima*. *Journal of Experimental Biology*, 219(5), 744-751. <https://doi.org/10.1242/jeb.131847>.

³ Anmerkung zum Urheberrecht auf der Website der *MDPI Open Access Journals*: "For all articles published in MDPI journals, copyright is retained by the authors." URL: <https://www.mdpi.com/authors/rights>, aufgerufen am 14.03.2023.

Tagungsbeiträge

Vorträge

Klampfleuthner, F. A. M., Lotz, B., Richter, W., & Diederichs, S. *Differential PI3K/AKT Activity During Endochondral Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells and Chondral Redifferentiation of Articular Chondrocytes.*

World Congress of the International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society, April 2022, Berlin. Der Vortrag wurde von Solvig Diederichs erstellt und präsentiert.

Klampfleuthner, F. A. M., Lotz, B., Richter, W., & Diederichs, S. *Regulation des PI3K/AKT-Signalweges zwischen enchondraler Differenzierung mesenchymaler Stromazellen und nicht-hypertropher Redifferenzierung artikulärer Chondrozyten.*

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Oktober 2021, Berlin.

Abstract wurde publiziert:

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2021). Berlin, 26.- 9.10.2021. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2021. DocAB86-1090. doi: 10.3205/21dkou585.

Poster

Klampfleuthner, F. A. M., Lotz, B., Richter, W., & Diederichs, S. *Differential PI3K/AKT Activity During Endochondral Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells and Chondral Redifferentiation of Articular Chondrocytes.*

Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS), Februar 2022, Tampa, FL, USA.

Klampfleuthner, F. A. M., Lotz, B., Richter, W., & Diederichs, S. *Differential Regulation of PI3K/AKT Signaling Between Endochondral Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells and Non-hypertrophic Maturation of Articular Chondrocytes.*

6th World Congress of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), November 2021, Maastricht, NL.

Klampfleuthner, F. A. M., Lotz, B., Richter, W., & Diederichs, S. *Differential regulation of PI3K/AKT signaling between endochondral differentiation of mesenchymal progenitor cells and non-hypertrophic maturation of articular chondrocytes.*

29th Annual Meeting of the European Orthopaedic Research Society (EORS), September 2021, Rom, IT.

Diederichs, S., Reimold, J., **Klampfleuthner, F. A. M.**, Richter, W. *Differentiation of human induced pluripotent stem cells to alkaline phosphatase-free chondrocytes.*

6th Annual Conference of the German Stem Cell Network (GSCN), September 2018, Heidelberg.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vornamen: Klampfleuthner, Felicia Anna Maria
Geburtsdatum: 13.06.1990
Geburtsort: Prien am Chiemsee
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet

Universitärer Werdegang:

12/2018: Annahme als Doktorandin an der Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

05/2017 - 03/2022: Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Universitätsklinikum Heidelberg
Promotion: Orthopädische Universitätsklinik,
Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie

04/2014 – 03/2017: Masterstudium Biologie
Universität Regensburg
Masterarbeit: „Der Einfluss von SOX9 und anaboler Stimulation auf die Chondrogenese von iPS-Zellen“
(durchgeführt am Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie, Universitätsklinikum Heidelberg)
Abschluss: Master of Science

10/2010 – 09/2013: Bachelorstudium Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Bachelorarbeit: „Habitat variability as an effect on breeding parameters in *Parus major*“ (durchgeführt am Max-Planck-Institut für Ornithologie, Seewiesen)
Abschluss: Bachelor of Science

Schulischer Werdegang:

09/2000 - 06/2009: Ludwig-Thoma-Gymnasium Prien am Chiemsee
Abschluss: Abitur

Danksagung

Allen voran möchte ich PD Dr. Solvig Diederichs danken, die mir über weite Teile meiner wissenschaftlichen Ausbildung und in allen Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit zur Seite gestanden hat. Vielen Dank für intensive wissenschaftliche Diskussionen, gemeinsames Austüfteln präziser Formulierungen und für den Ansporn durchzuhalten, um es am Ende besser zu machen. Deine engagierte Betreuung weit über *nine to five* hinaus hat wesentlich zu meiner wissenschaftlichen wie auch persönlichen Entwicklung beigetragen. Ohne deine kontinuierliche Unterstützung wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen und ich danke dir für unsere erfolgreiche und harmonische Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Wiltrud Richter, die es mir ermöglicht hat, im Anschluss an meine Masterarbeit auch meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Dein immenser Erfahrungsschatz und deine wertvollen Ratschläge haben dieses Projekt sehr bereichert. Die Erfahrungen, die ich in dieser herausragenden Forschungsgemeinschaft unter exzellenten Bedingungen wissenschaftlich wie auch zwischenmenschlich sammeln konnte, werden meinen zukünftigen Weg stark prägen. Danke für deine Unterstützung, eine bessere Wissenschaftlerin zu werden.

Auch den Ärztinnen und Ärzten der Klinik für Orthopädie möchte ich für das Bereitstellen des Probenmaterials und allen damit verbundenen Aufgaben danken. Die netten Begegnungen im OP werde ich immer in guter Erinnerung behalten.

Danke sagen möchte ich auch allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die eine so wichtige Komponente dieser Arbeit waren. Unser starker Zusammenhalt und die tolle Arbeitsatmosphäre haben entscheidend zu dieser Promotion beigetragen. Durch euch wurde das Labor zu einem zweiten Zuhause und auch lange Arbeitstage waren erträglich. Danke, dass ich mit fachlichen und emotionalen Fragen immer zu euch kommen konnte. Meine lieben Mitdoktoranden, wenn ich in 20 Jahren an meine Promotion zurückdenke, seid ihr die Ersten, die mir einfallen. Bedanken möchte ich mich auch bei Birgit Frey für die hervorragende Hilfestellung bei allen Fragen der Histologie und bei Barbara König für die tatkräftige Unterstützung bei Paper-relevanten Kollagen-II-Färbungen. Ein herzliches Dankeschön auch an Petra Glück und Tetyana Fragnito für alle liebevollen Gesten, die den Laboralltag bereichern haben.

I would particularly like to thank Dr. Safak Chasan for being a great support in every manner. Mein herzlicher Dank gilt auch Dr. Janine Lückgen und Carina Binder. Eure fachliche und emotionale Unterstützung in jeder Labor- und Lebenslage hat mich oft gerettet und tut es immer wieder. Von Herzen danken möchte ich auch meiner langjährigen Raum-13-Kollegin Dr. Ursula Kreuser, die mich in jeder Phase dieser Promotion und weit über das Labor hinaus auffängt, wenn ich nicht weiter weiß. Ich danke euch für bereichernde Gespräche über die

kleinen und großen Dinge des Lebens und für wunderbare gemeinsame Momente. Mädels, unsere Freundschaft bedeutet mir viel.

Danke sagen möchte ich auch der gesamten Familie Hammersen, allen voran Isa und Dirk, deren kontinuierliche und fürsorgliche Unterstützung das Durchhalten leichter gemacht hat. Danke, dass ihr immer für uns da seid!

Von Herzen danke ich meiner Familie, die mir in jeder Situation beisteht, komme was wolle. Alina, Veronica, Julia, Franziska, danke, dass ich mit allem immer zu euch kommen kann. Danke, Andrea, für die kleinen Aufmunterungen und gedanklichen Inselauszeiten, wenn es stressig war. Danke, Oma, dass du mich immer daran erinnerst, dass Leistung auch Regeneration erfordert. Mein größter Dank gilt meinen Eltern Isolde und Georg und meiner Schwester Sophia für ihren bedingungslosen Rückhalt in jeder Situation meines Lebens. Die Gewissheit, immer auf euch zählen zu können, macht es leicht, Dinge zu wagen. Mama, Papa, danke, dass ihr mich immer dazu ermutigt, neugierig zu sein, und dass ihr es mir ermöglicht habt, Erfahrungen zu sammeln, die mich zu diesem Punkt meines Lebens geführt haben. Sophia, danke, dass du meine Sicht durch deine Perspektive bereicherst, gerade an schwierigen Tagen immer die richtigen Worte findest und dir Kontrollmäuse „irgendwie lieb“ vorkommen. Du glaubst an mich, wenn ich es nicht kann, und gibst mir Kraft, es durchzuziehen.

Tim, mit niemandem hätte ich 24/7 lieber umgesetzt als mit dir. Auch in schwierigen Phasen bringst du mich mit deiner liebe- und humorvollen Art zum Lächeln und zeigst mir so, was wirklich wichtig ist. Danke für deinen fachlichen Input, den gelegentlichen Rat, es auch einfach mal gut sein zu lassen, und deine Liebe, die jeden Tag schöner macht. Das Beste an dieser Promotion bist Du.

Ohne euch alle hätte ich es nicht geschafft. Danke.

Eidesstattliche Versicherung

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Die Relevanz der AKT-Aktivierung für die *In-vitro*-Chondrogenese humaner mesenchymaler Stromazellen

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg, den 28. April 2023

Ort und Datum



Unterschrift