

Abschlussbericht

1. Antragsteller

PD Dr. Gundula Schulze-Tanzil und Prof. Dr. Wolfgang Ertel
Charité-Universitätsmedizin Berlin, CBF
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Garystrasse 5, 14195 Berlin

2. Projektname

Entwicklung eines biologischen Bandscheibenersatzes im Ko-kulturmodell

3. Projektcode der Verwaltung des Förderbetragsempfängers: 8973511501

4. Datum des Zuwendungsbescheides: 13.12.2012

5. Einleitung

Die komplexe Architektur der Bandscheibe (BS, Abb. 1-2) stellt ein Hindernis für die Entwicklung regenerativer Therapieansätze zur BS-Rekonstruktion dar. Um mesenchymale Stammzellen oder andere chondrogen differenzierbare Zellen zukünftig für den BS-Ersatz verwenden zu können, müssen verlässliche Differenzierungsmarker zur Verfügung stehen. Da bekannt ist, dass Chondrozyten, Fibrochondrozyten und andere Chondrozyten-ähnliche Zellen in der Monolayerkultur dedifferenzieren, sind geeignete dreidimensionale Kulturen, die die *in vivo* Bedingungen eher widerspiegeln für die Kultur von BS-Zellen erforderlich. Die chondrogenen Stimuli, die mesenchymale Stammzellen in einen BS-like Zelltyp differenzieren lassen, sind weitgehend noch unklar. Daher wurde in dem vorliegenden Projekt u.a. eine Ko-Kultur von MSCs mit einer natürlichen extrazellulären Bandscheibenmatrix als Scaffold durchgeführt.

6. Zielsetzung

Das Ziel der Studie war es daher zunächst das *in vitro* und *in situ* Expressionsprofil von *Annulus fibrosus* (AF) und *Nucleus pulposus* (NP) Zellen der menschlichen BS genauer zu identifizieren, die Stabilität der Markerexpression bei der Zellexpansion zu verfolgen und den Einfluss von Zellisolierungsverfahren auf das Expressionsprofil zu analysieren. Im Folgenden wurden Hydrogelkultursysteme mit AF- und NP-Zellen etabliert und das Verhalten von AF und NP Zellen in diesen betrachtet. Schließlich wurde eine dezellularisierte BS-Matrix hergestellt und dieses Zell-freie BS-Matrix Scaffold mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) kokultiviert.

7. Methoden

Neben dem Nachweis typischer Proteine der BS (Kollagen Typ I, II, Sox9) sollte die Expression von Ligamentmarkern in der nativen BS *in situ* überprüft werden. Die Ergebnisse sollten dem Vergleich zum Expressionsprofil *in vitro* kultivierter BS-Zellen dienen.

Paraffinschnitte von BS wurden mit Hilfe von histologischen und immunhistologischen Färbungen untersucht.

Die *in vitro* Versuche sollten das Expressionsprofil von AF und NP Zellen der menschlichen BS in Beziehung zur Kulturdauer darstellen. Für die Versuche wurden Monolayerkulturen verwendet. Zunächst wurden BS-Zellen (AF und NP Zellen gepooled), die mittels zweier unterschiedlicher Isolierungstechniken (enzymatische Zellfreisetzung vs. Zellgewinnung via Explantkultivierung) gewonnen wurden, in Passage (P) 2 miteinander verglichen (morphologisch sowie das Expressionsprofil auf Protein- und Genexpressionsebene).

Das Projekt setzte sich nun fort mit einer kurzen Charakterisierung der frisch enzymatisch isolierten und im Monolayer kultivierten BS-Zellen hinsichtlich der Gen- und Proteinexpression von ausgewählten Markerproteinen (Real time PCR und Immunmarkierungen). Eine frühe (P2-3) und eine späte Kulturpassage (P6) wurden einbezogen, um durch die Kultivierung induzierte Differenzierungsverluste zu erkennen. Es erfolgte eine Darstellung der Gen- und Proteinexpression von ausgewählten Markerproteinen (Kollagen Typen I, II, III, Sox9, Cartilage Oligomeric Protein [COMP], Aggrekan, Decorin, die Ligamentmarker Scleraxis und Tenascin C).

Hydrogelkulturen könnten eine Möglichkeit darstellen, den phänotypischen Shift von BS-Zellen in der Kultur aufzuhalten. Zur Herstellung des 3D Konstruktes aus Bandscheibenzellen wurden Alginate-, und Kollagengele als Modellsystem ausgewählt. Das Verhalten der BS-Zellen (AF und NF Zellen) in dieser 3D-Kultur wurde mit den Ergebnissen der oben genannten Charakterisierung verglichen.

Scaffolds aus dezellularisierter extrazellulärer Matrix (ECM) finden aufgrund ihrer biomimetischen Eigenschaften zunehmendes Interesse in vielen Gebieten des Tissue Engineering. Das Ziel einer Dezellularisierung eines Gewebes ist die bestmögliche Entfernung der immunogenen zellulären Komponenten und gleichzeitig bei maximalem Strukturerthalt den Verlust von essentiellen Matrixkomponenten gering zu halten. In einer früheren Studie konnten wir ein Dezellularisierungsprotokoll zur Gewinnung einer zyokompatiblen porcinen Sehnen-ECM etablieren (Schulze-Tanzil G et al., 2012; Lohan A et al., 2013), die für die Wiederbesiedlung mit humanen Tendozyten geeignet war. Eine Zell-freie BS ECM bietet eine Nische und Stimuli, die die chondrogene Differenzierung von MSC in einen BS-ähnlichen Phänotyp ermöglichen könnte. Daher wurden im Projekt die durch verschiedene Dezellularisierungsprotokolle ausgelösten Veränderungen an zellbefreiten NP und AF Scaffolds im Vergleich zum nativen Gewebe auf histologischer (Hematoxylin-Eosin [HE], Alcianblau [AB], DAPI) und biochemischer Ebene untersucht. Die Zytokompatibilität der ECM und der Wiederbesiedlungserfolg wurden bei Verwendung dynamisch kultivierter MSCs oder BS-Zellen mittels Vitalitätsassay und histologischer Färbungen dargestellt.

8. Ergebnisse

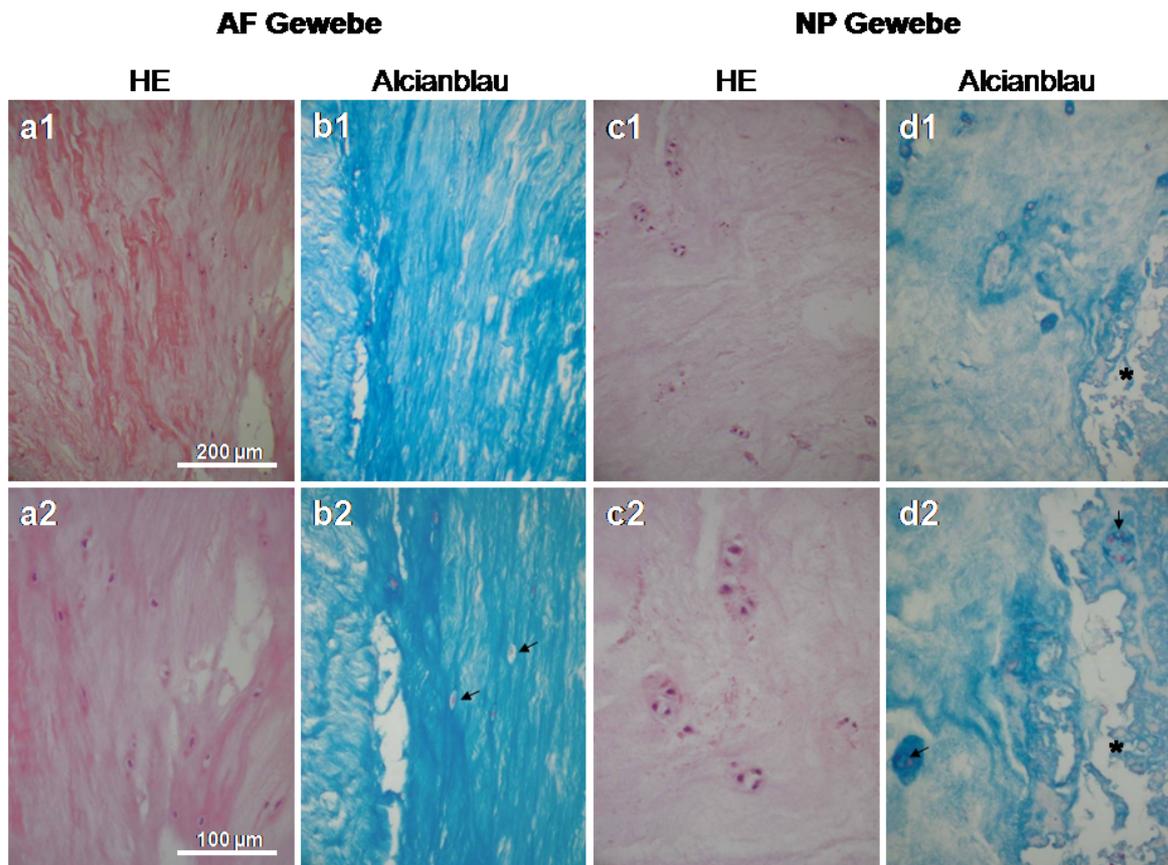


Abb. 1: Bandscheibengewebe: *Anulus fibrosus* (AF) und *Nucleus pulposus* (NP). Hämatoxylin-Eosin (HE)- und Alcianblau (AB)-Färbungen. Pfeile: AF Zellen in Lakunen und Cluster von NP Zellen, umgeben von Glykosaminoglykan-reicher extrazellulärer Matrix (blau). *: fokale degenerative Areale im NP. Messbalken: 100 µm.

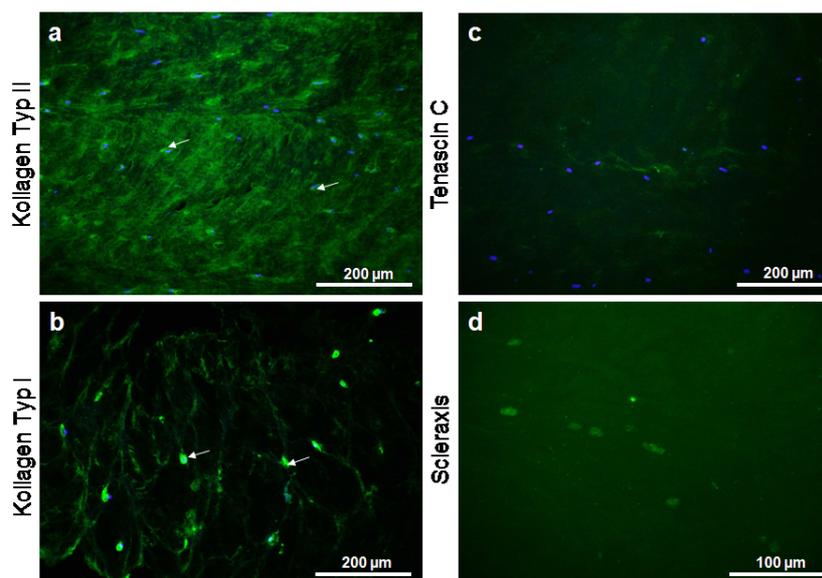


Abb. 2: Immunhistologische Analyse der Bandscheiben *in situ*. Kollagen Typ II, I, Tenascin C und Scleraxis Expression in AF Gewebe ist immunfluoreszenzmikroskopisch (grün) dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. AF Zellen sind in ihren Lakunen von einer Kollagen Typ II und I reichen extrazellulären Matrix umgeben (Pfeile). Messbalken (Kollagen Typ II, I, Tenascin C): 200 µm; (Scleraxis): 100 µm.

Charakterisierung der Bandscheibe *in situ*

Die histologischen Färbungen zeigten die charakteristische histologische Struktur von AF und NP Gewebe und seinen Reichtum an Glykosaminoglykanen auf (Abb. 1). In einigen Proben konnten auch degenerative Veränderungen wie Zellcluster beobachtet werden. Schließlich wurden für den *in vitro/in situ* Vergleich Paraffinschnitte menschlicher Bandscheiben für Knorpel- und Ligament-Markerproteine immunmarkiert. Wie erwartet, fand sich eine Immunreaktivität für Kollagen Typ I und II, insbesondere in der perizellulären Matrix. Der typische Fibroblastenmarker Tenascin C konnte *in situ* nicht nachgewiesen werden. Eine nukleäre Immunoreaktivität für den Ligamentmarker Scleraxis war *in situ* nachweisbar (Abb. 2).

Charakterisierung von *Nucleus pulposus* und *Annulus fibrosus* Zellen

Hinsichtlich der Isolierungsmethoden war zu beobachten, dass die Morphologie der Zellen keine Unterschiede aufwies (Abb. 3). Die Gene für Kollagen Typ I, III, Aggrecan und Decorin waren jedoch stärker in enzymatisch isolierten Zellen exprimiert als in solchen, die über eine Explantkultur gewonnen wurden. Die COMP, Sox9 und Scleraxis Gene dagegen waren in den enzymatisch isolierten Zellen geringer exprimiert.

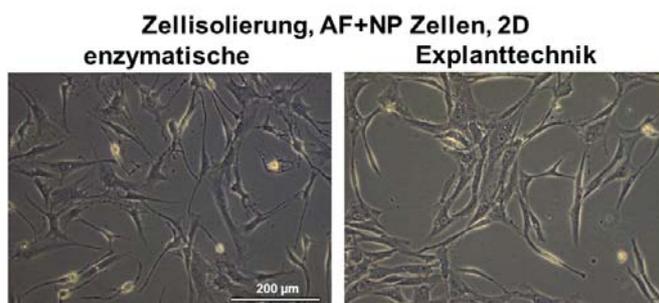


Abb. 3: Gegenüberstellung von BS-Zellen, die über eine Explanttechnik oder eine enzymatische Zellisolierung gewonnen wurden. Es zeigen sich keine morphologischen Unterschiede. Messbalken: 200 µm.

Zwischen AF und NP Zellen waren in beiden Passagen Unterschiede zu erkennen, die NP Zellen zeigten eine langgestrecktere Gestalt und wuchsen generell in geringerer Zelldichte (Abb. 4).

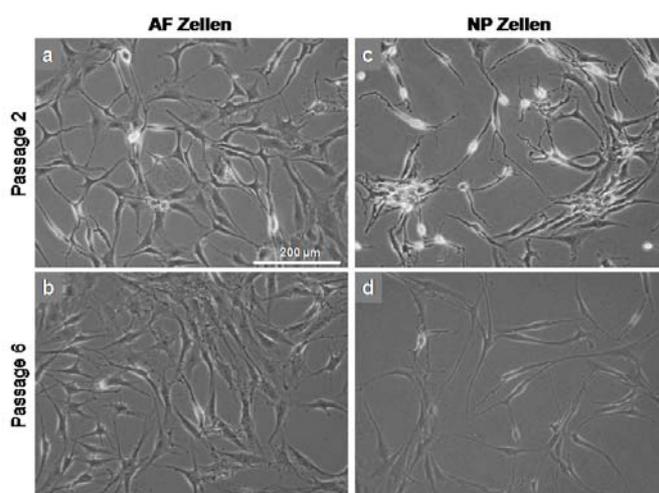


Abb. 4: Morphologie der Bandscheibenzellen in Abhängigkeit von Isolierungstechnik und während der Expansion in der Monolayerkultur. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Bandscheibenzellen, die über eine Explantkultur oder durch eine enzymatische Zellisolierung gewonnen wurden sowie enzymatisch isolierter *Nucleus pulposus* (NP) und *Anulus fibrosus* (AF) Zellen in Passage 2 und 6 sind gezeigt. Messbalken: 200 µm.

BS-Zellen exprimierten auch auf Genexpressionsebene den Sehnen-/Ligamentmarker Scleraxis. Beim Vergleich des Genexpressionsprofils der isolierten AF und NP Zellen zeigten sich in der P2-3 noch deutliche Unterschiede für die Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox9 sowie des Proteoglykans Decorin (in NP Zellen höher) und Kollagen Typ I (in NP Zellen geringer), aber nicht mehr in P6.

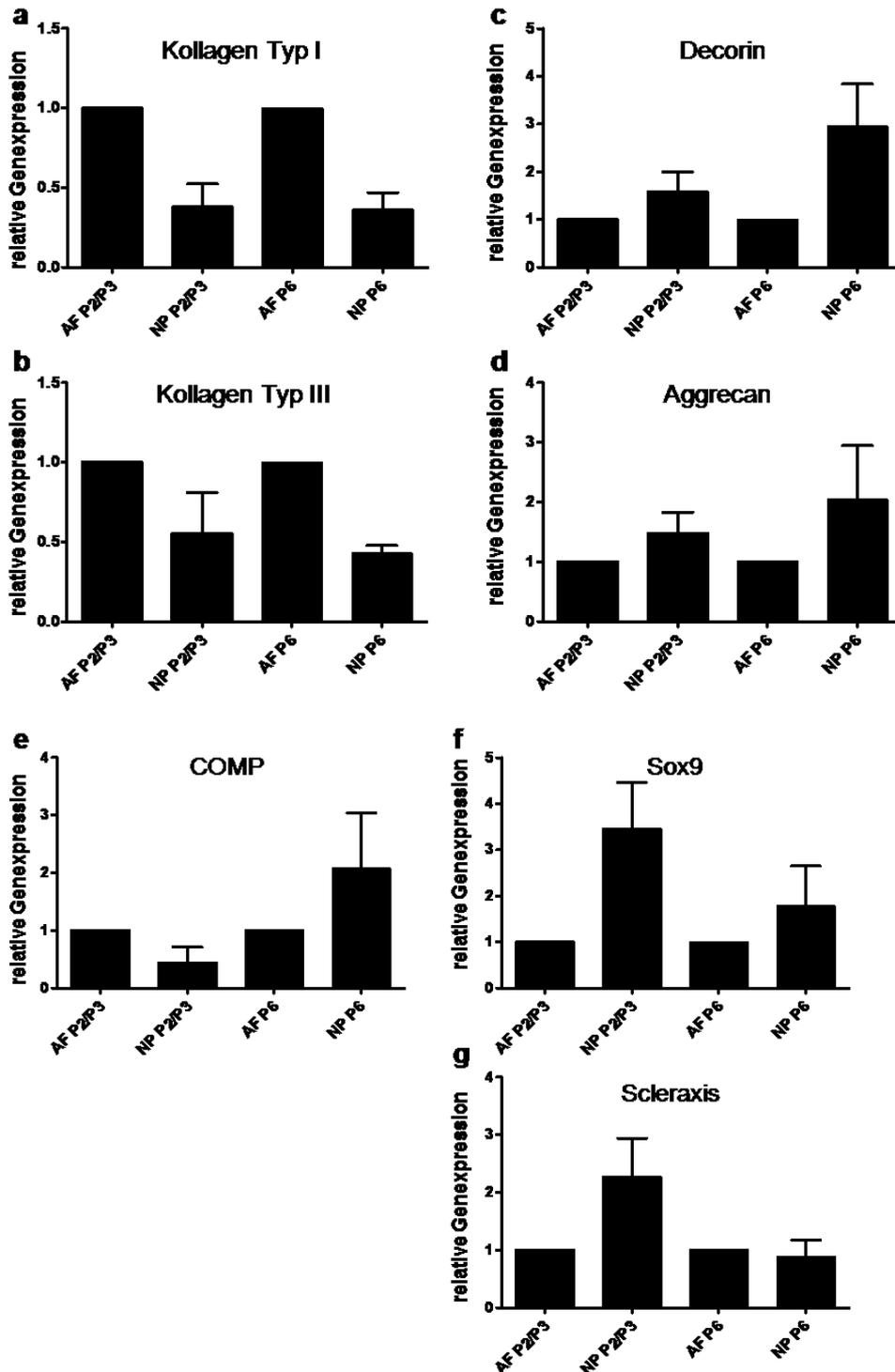


Abb. 5: Genexpression in AF und NP Zellen (Passagen 2 und 6) in der Monolayerkultur. Beide Zelltypen exprimierten Kollagen (Koll.) Typ I, Sox9, Decorin, Aggrecan, COMP und Scleraxis über den Kultivierungszeitraum von 6 Passagen. Die Genexpression ist gegenüber β -Aktin normalisiert. Außerdem wurde die Genexpression der AF Zellen für P2-3 und für P6 normalisiert.

Über eine Immunfluoreszenzmarkierung konnte die Expression des Fibroblastenmarkers Tenascin C in kultivierten NP und AF Zellen nachgewiesen werden, *in situ* war sie jedoch nicht nachweisbar (Abb. 6). Kollagen Typ II ließ sich auf Proteinebene *in vitro* und *in situ* nachweisen, wobei die Expression in P6 geringer wurde. Sox9 als chondrogener Transkriptionsfaktor war nachweisbar sowie Decorin. Die Zytoskelett-Aktinarchitektur wurde mit zunehmender Passagierung in beiden Zellpopulationen prominenter (Abb. 6).

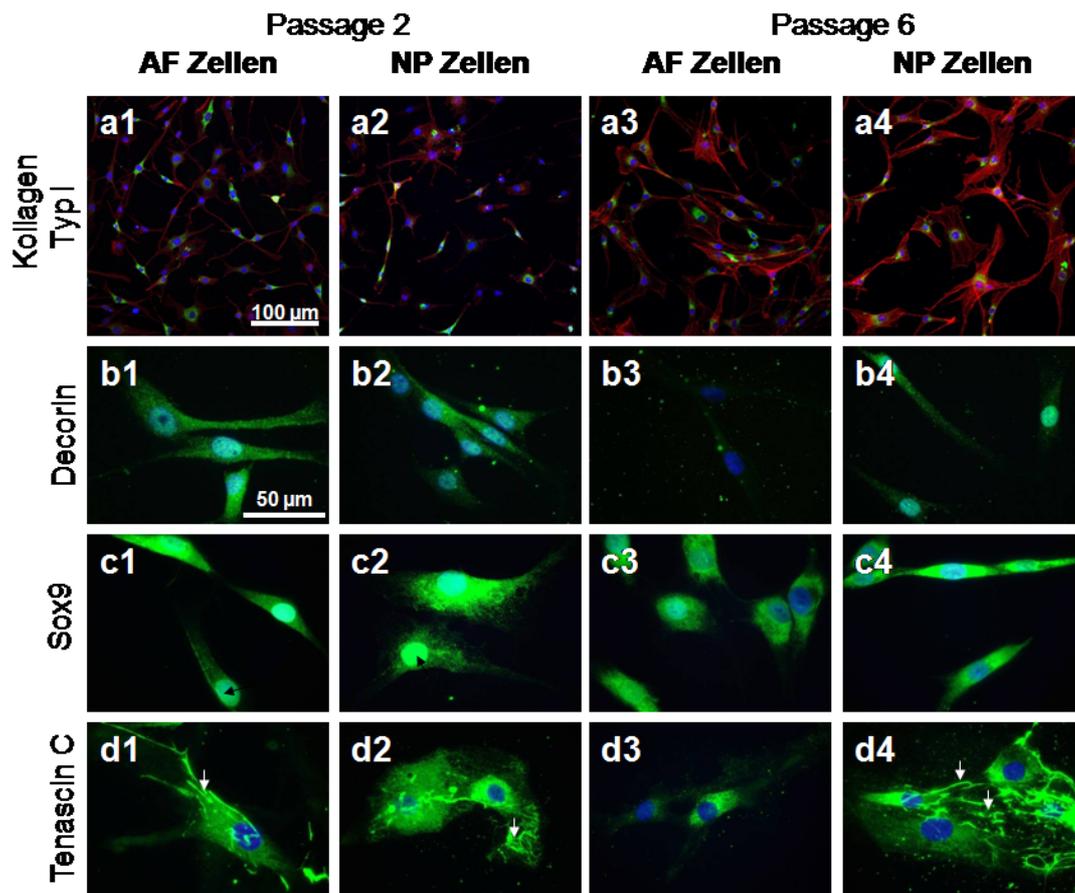


Abb. 6: Proteinexpression in AF und NP Zellen (Passagen 2 und 6) in der Monolayerkultur. Beide Zelltypen exprimierten Kollagen (Koll.) Typ I, Sox9, Decorin und Tenascin (Tenasc.) C (grün) über den Kultivierungszeitraum von 6 Passagen. Die Aktin-Zytoskelettstruktur, dargestellt mit Phalloidin-555 (rot) war in der höheren Passage ausgeprägter in beiden Zelltypen. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Messbalken: 50 und 100 μ m. Pfeile: Fibrillen-ähnliche Strukturen immunreaktiv für Tenascin C in AF und NP Zellen.

Hydrogelkulturen mit Nucleus pulposus und Annulus fibrosus Zellen

Die NP-Zellen und z.T. auch die AF-Zellen konnten sich im Kollagengel strecken, nicht aber im Alginategel (Abb. 7+8). Beide Hydrogele zeigten eine hohe Zytokompatibilität gegenüber beiden Zellpopulationen, denn die meisten Zellen

waren nach 7 Tagen im Gel noch vital (Abb. 8). Die Zellen waren gleichmäßig in den Gelen verteilt und zeigten z.T. auch eine Proliferation (Abb. 9).

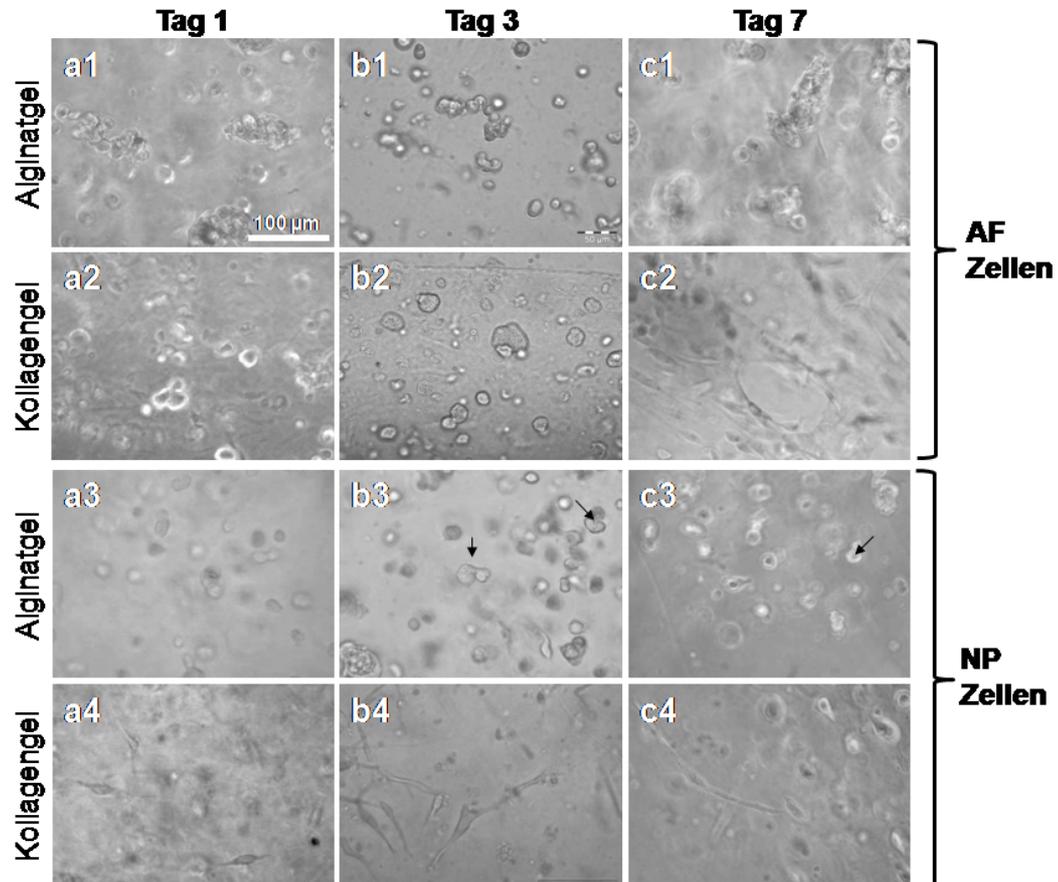


Abb. 7: Morphologie der AF und NP Zellen in einer Hydrogelkultur. Lichtmikroskopische Aufnahmen von NP und AF Zellen, die für 3 und 7 Tage in Alginat- oder Kollagenhydrogele eingeschlossen wurden. Pfeile: proliferierende Zellen. Messbalken: 100 µm.

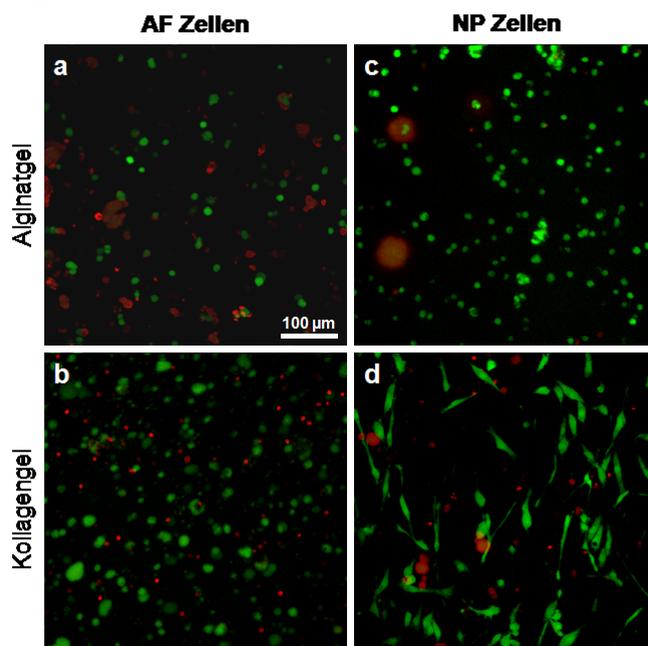


Abb. 8: Vitalität von AF und NP Zellen in der Hydrogelkultur. Die Zellvitalität wurde mittels Lebend-Totfärbung und Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie dargestellt. Lebende Zellen: grün, tote Zellen: rot. Messbalken: 100 µm.

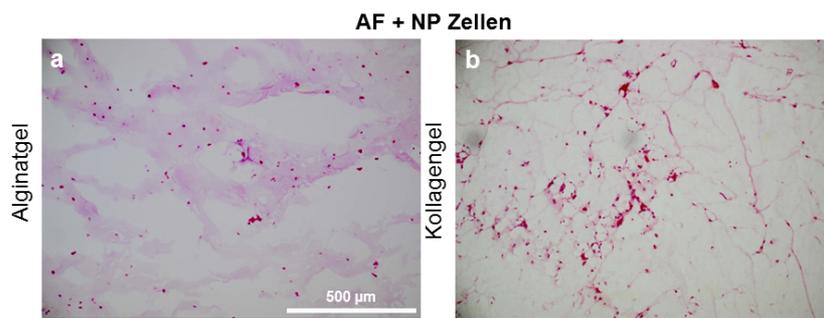


Abb. 9: Histologische Struktur von BS-Zellen in Hydrogelkulturen. BS-Zellen wurden in Alginat- und Kollagengele eingebettet für 7 Tage und dann HE-gefärbt. Messbalken: 500 µm.

Gewinnung einer dezellularisierten BS-Matrix und Ko-Kultur mit BS-Zellen

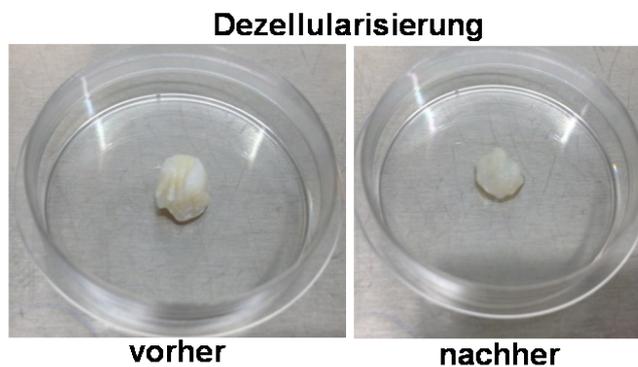
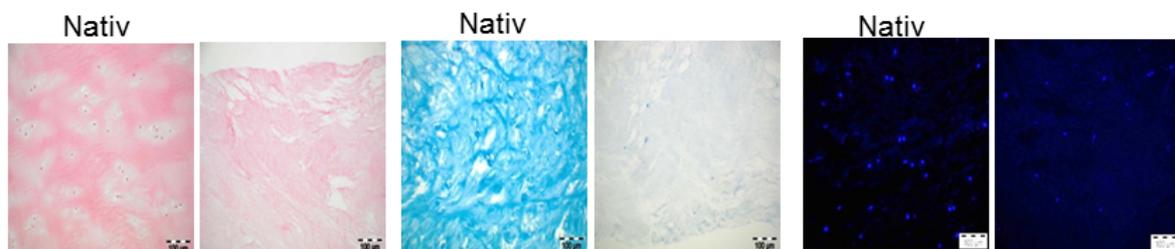


Abb. 10: Makroskopische Ansicht der Scaffolds vor und nach Dezellularisierung. Es war keine makroskopische Veränderung in der bzgl. der Gewebestruktur nachweisbar.

NP Gewebe



AF Gewebe



Abb. 11: HE, Alcianblau und DAPI-Färbungen von dezelluliertem AF und NP Gewebe im Vergleich zur nativen Kontrolle. HE- und Alcianblaufärbung zeigen den **Dezellularisierungserfolg**. Es ist in der HE-Färbung eine Struktureinbuße, in der Alcianblaufärbung ein GAG-Verlust zu erkennen – beide Färbungen zeigen keine Zellen mehr. In der DAPI-Färbung sind allerdings noch einige Zellkerne erkennbar, jedoch in deutlich reduzierter Anzahl. Messbalken: 100 µm.

Für die Gewinnung Zell-freier BS-Scaffolds war die Etablierung von Einfrier-/Auftauzyklen, die Inkubation mit 2% Natriumdodecylsulfat (SDS), mit 0,25% Trypsin,

3% Triton X100 im Hinblick auf die Zellentfernung effektiver als eine DNase Behandlung. Durch eine Behandlung mit Bovinen Serum Albumin (BSA) konnten SDS Rückstände inaktiviert werden, dadurch die Toxizität zu reduziert und eine homogenere Zellverteilung bei Wiederbesiedlung mit MSCs erreicht werden. Die Dezellularisierung führte insgesamt zu einem Verlust von Glykosaminoglykanen (GAGs).

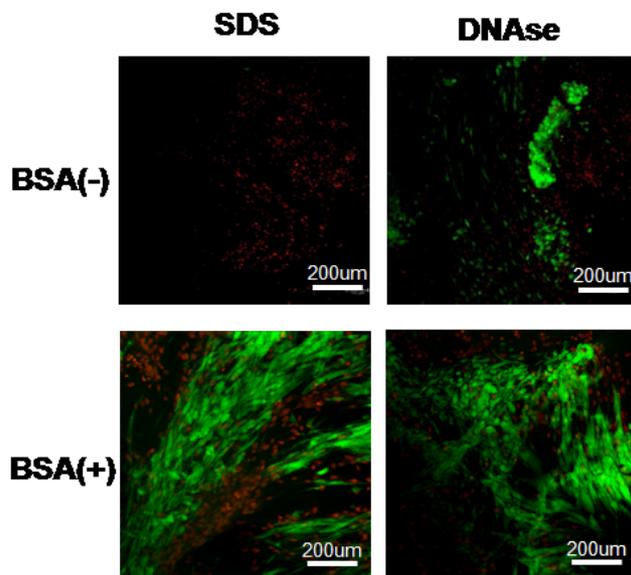


Abb. 12: Rezellularisierung von dezellularisierten Scaffolds mit MSCs. Die Scaffolds wurden nach 2 verschiedenen Protokollen entweder mit SDS oder DNase-Behandlung dezellularisiert. Anschließend wurde entweder eine Inkubation der Scaffolds mit BSA vor der Wiederbesiedlung durchgeführt oder nicht. Schließlich wurde für eine Woche mit MSCs rezellularisiert. Messbalken: 200 µm.

Die zellfreien Scaffolds erwiesen sich als zytokompatibel und ließen eine Besiedlung mit MSCs und BS Zellen zu.

Diskussion:

Bei der Expansion von Bandscheibenzellen *in vitro* muss neben einer Dedifferenzierung der Einfluss des Isolierungsverfahrens auf ihr Expressionsprofil beachtet werden. Ebenso muss berücksichtigt werden, dass Bandscheibenzellen in der Kultur Marker exprimieren wie z.B. Tenascin C, die *in situ* nicht nachgewiesen werden können. Die Interpretation der nukleären Expression von Scleraxis, könnte Hinweise auf die Rolle dieses Transkriptionsfaktors in der Kollagen Typ I Expression andeuten, die weitere Untersuchungen erfordern. Das in BS-Subpopulationen identifizierte Expressionsprofil hilft die chondrogene Differenzierung von Stammzellen in einen BS-like Phänotyp genauer zu beurteilen und ist eine wichtige Basis für weiterführende Untersuchungen. Eine natürliche Zellfreie BS-Matrix könnte adequate Stimuli für eine stabile Differenzierung von MSCs bieten.

Dezellularisierungsprotokolle müssen jedoch sorgfältig an jedes Gewebe angepasst werden, ihre Effizienz hängt von zahlreichen Faktoren ab wie Gewebeareal (e.g., AF, NP), Konzentration und Behandlungszeit der Enzyme/Detergentien. Gewebe ohne interkonnektive Makroporen wie Knorpel stellen eine besondere Herausforderung für die Dezellularisierung und Wiederbesiedlung dar. Es könnte ein Protokoll für die Bandscheibe etabliert und optimiert werden. Mit Hilfe von BSA konnten unerwünschte Nebeneffekte von SDS reduziert werden und damit ist eine Verlängerung der SDS Einwirkzeit zur Verbesserung der Zelllyse umsetzbar.

Zukünftig müssen Strategien entwickelt werden, den GAG-Verlust bei der Dezellularisierung zu reduzieren und eine optimale GAG-Synthese bei der Rezellularisierung durch die Zellen zu erreichen. Die zellfreien Scaffolds stellen zukünftig eine vielversprechende Möglichkeit für das BS Tissue Engineering dar.

Veröffentlichungen:

Posterbeitrag auf dem 8. Deutschen Wirbelsäulenkongress in Frankfurt, 2013: Schulze-Tanzil G, Lemke M, Meier C, Ertel W (2013) *In vitro/in situ* Charakterisierung von Zellen der menschlichen Bandscheibe für Knorpel- und Ligamentmarker.

Posterbeitrag eingereicht für den 9. Deutschen Wirbelsäulenkongress in Leipzig, 2014: Huang Z, Schulze-Tanzil G, Kohl B, Ertel W (2014) Bandscheiben Tissue Engineering auf der Basis einer Zell-befreiten extrazellulären Matrix.

Manuskript (accepted): Schulze-Tanzil G, Lemke M, Meier C, Ertel W, Kohl B, Muschik M, Markart M, Hoyer M, Arens S. Characterization of human *anulus fibrosus* and *nucleus pulposus* derived cells during monolayer expansion and in hydrogel cultures. **Bone and Tissue Regeneration Insights.**

Bachelorarbeit: Tissue Engineering eines Bandscheibenersatzes auf der Basis von Zellen der Bandscheibe und mesenchymalen Stammzellen. Ke Wang, im Studiengang Bachelor Biochemie, Freie Universität Berlin, 2013.