

VERKNO

CHERT?

VERKNÖCHERT?

NEUE BIOMATERIALIEN FÜR STABILE GELENKE

WILTRUD RICHTER

Knochen und Knorpel geben dem Körper Halt. Doch wie entstehen die beiden wichtigen Stützstrukturen? Heidelberger Forscher:innen haben die molekularen Weichen für die Entwicklung in Richtung „eher hart“ oder „eher weich“ erkannt. Ihre Erkenntnisse eröffnen neue Chancen für die regenerative Medizin, etwa für eine effiziente Behandlung von Knorpelschäden mit Biomaterialien.

D

Das Leben der Wirbeltiere inklusive des Menschen ist ohne Skelett nicht denkbar. Wie aber entstehen harte Stützstrukturen inmitten von Weichgewebe? Das Wissen um diese grundlegenden biologischen Vorgänge lässt sich für die regenerative Medizin nutzen, die Erkrankungen heilen will, indem sie funktionsgestörtes Gewebe wiederherstellt, etwa mit eigens dafür herangezuchteten biologischen Ersatzgeweben. Ein Beispiel sind Knorpeldefekte von mehreren Quadratzentimetern Größe, die nach Unfällen und Verletzungen chirurgisch versorgt werden, damit sie sich nicht zu einer flächigen Knorpeldegeneration, der Arthrose, und damit der weltweit häufigsten Gelenkerkrankung weiterentwickeln. Derzeit gibt es keine Behandlung, die solche Knorpeldefekte komplett heilen könnte. Die Hoffnungen liegen hier auf regenerativen Ansätzen, die den Aufbau und die Aufgaben des menschlichen Knorpels mittels neuer Zellen in biologischen Trägermaterialien wiederherstellen wollen. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist es, die molekularen Signalwege und Schaltpläne zu kennen, die der Körper nutzt, um in Vorläuferzellen die Weichen für die Entwicklung in Richtung Knorpel oder in Richtung Knochen zu stellen.

Knorpel und Knochen

Die Evolution hat viele stützende Gewebearten hervorgebracht. Bei den heute lebenden Wirbeltieren finden sich nur noch zwei: Knorpel und Knochen. Beiden ist gemeinsam, dass sie sich im Unterschied zu den weichen Geweben durch Steifigkeit und Widerstandskraft auszeichnen.

„Bis heute ist der Aufbau von Ersatzgeweben aus mehr als einer Gewebeart eine große Herausforderung.“

Diese Gemeinsamkeit beruht jedoch auf zwei völlig unterschiedlichen Bauprinzipien. Die Steifigkeit und der Kompressionswiderstand von Knorpel basiert vorwiegend auf den Eigenschaften seiner „extrazellulären Matrix“. Das ist die mächtige Grundsubstanz zwischen den Knorpelzellen, in der sich Kollagenfasern (Typ II) quer vernetzen und dabei Proteoglykane, hochmolekulare Zucker-Protein-Verbindungen, und Glykosaminoglykane, Mehrfachzucker, einschließen. Die Zuckerreste der oft sehr großen Proteoglykane werden durch das Anheften von Sulfatgruppen stark mit negativer Ladung versehen: Das zieht Wasser an, woraufhin sich ein Schwellendruck gegen den Widerstand der Kollagenfasern aufbaut, was das Gewebe stark verfestigt. Unter Last wird Wasser herausgepresst, und der Knorpel gibt nach. Wird die Last geringer, kehrt der Knorpel aufgrund der Wasseranziehung wieder in seine ursprüngliche Form zurück.

Reicht die Steifigkeit des Knorpels nicht aus, kann nachträglich Kalziumphosphat eingelagert und das Knorpelgewebe so mineralisiert werden. Die Mineralisierung geht zulasten der Komprimierbarkeit, versteift den Knorpel jedoch so weit, dass die größten heute lebenden Fischarten, etwa Haie und Rochen, die tragende und stützende Funktion ihres Skeletts ausschließlich Knorpelgewebe verdanken. Die im Vergleich größere Härte von Knochen beruht dagegen auf einer schnellen Mineralisierung seiner extrazellulären Matrix, die vorwiegend aus Kollagen vom Typ I und aus Proteinen besteht, die Kalzium binden können. Ein weiterer Unterschied zum Knorpel ist die komplexe Knochenarchitektur aus balkchenartigen Gewebestrukturen – sogenannten Trabekeln – sowie Röhren, die sich lebenslang entlang mechanischer Belastungszonen umbauen können.

Zonen des Wachstums

Knorpel wächst schnell und behält dabei dennoch seine Festigkeit. Das macht ihn zum bevorzugten Stützgewebe für den Embryo: Fast das gesamte Skelett des Embryos wird zunächst als Modell aus Knorpel angelegt. Während der weiteren Embryonalentwicklung mineralisiert das Knorpelgewebe und wird nach und nach durch harten Knochen ersetzt. Nach der Geburt sind vom ehemaligen Knorpelskelett nur noch wenige, aber sehr essenzielle Bereiche übrig: Knorpel findet sich zum einen in den sogenannten Wachstumsfugen an beiden Endstücken der Knochen, wo das Längenwachstum der Röhrenknochen stattfindet. Am Ende der Pubertät ist das Längenwachstum abgeschlossen – dann ist die Wachstumsfuge verknöchert, Knorpel ist nicht mehr vorhanden. Knorpel – medizinisch korrekt der „hyaline artikulare Knorpel“ – bleibt zum anderen in den Gelenken erhalten und erlaubt es den lasttragenden Knochen, sich reibungsarm zu bewegen. Er liegt der sehr harten Knochenplatte oberflächlich auf und ist von ihr durch eine dünne mineralisierte

Knorpelschicht getrennt. An den Enden der langen Röhrenknochen besteht also ein zonaler Härteabfall vom harten Knochen über eine weniger harte Zwischenschicht aus mineralisiertem Knorpel hin zum komprimierbaren Gelenkknorpel. Das ist für die mechanische Funktion des Gelenks entscheidend.

Aus aktueller wissenschaftlicher Sicht kann man den Gelenkknorpel als oberflächlich gelegene wachstumsfugenähnliche Struktur interpretieren, die sich im Unterschied zu den Wachstumsfugen in Kindheit und Jugend nicht schließt, sondern ein Leben lang erhalten bleibt. Dazu muss der Körper in dieser Region die Weiterentwicklung von Knorpel zu Knochen dauerhaft stoppen, um die nützlichen Funktionen des Knorpels zu bewahren. Vielfältige Störungen des physiologischen Gleichgewichts können jedoch dazu führen, dass Knorpel zu mineralisieren beginnt und sich in Richtung Knochen entwickelt. Bei der Arthrose etwa ist zu beobachten, dass die mineralisierte Knorpelschicht zunimmt und sich zulasten des weicheren hyalinen Knorpels ausdehnt. Auch in den hyalinen Knorpel werden schließlich mineralische Kristalle eingelagert, woraufhin er zunehmend degeneriert und schließlich ganz verschwindet. Das Ziel unserer Forschungsarbeiten am Zentrum für Experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums Heidelberg ist es, diejenigen molekularen Signale zu identifizieren, welche die Entwicklung von Knorpel zu Knochen zeitlich und räumlich steuern, um entscheidende Haltesignale zu finden, mit denen die Degeneration gestoppt werden kann.

Herausforderung Knorpelregeneration

Bewertet man die natürliche Regenerationsfähigkeit von Knorpel im Vergleich zum Knochen, finden sich beide an den gegenüberliegenden Enden der Skala: Knochen kann lebenslang narbenlos regenerieren, Knorpel kann vom Körper nicht ersetzt werden. Um umschriebene Knorpeldefekte mit erhaltener Knorpelschulter zu behandeln, hat die Medizin verschiedene Verfahren entwickelt. Ein Beispiel ist die „Mikrofrakturierung“, eine operative Methode, die darauf zielt, Stammzellen aus dem Knochenmark anzulocken, die sich in Knorpelzellen umwandeln können. Ein anderes Beispiel ist die „autologe Knorpelzelltransplantation“, wozu dem Patienten körpereigene (autologe) Knorpelzellen entnommen, im Labor vermehrt und auf einem Trägermaterial in den Knorpelschaden eingebracht werden. Die Beschwerden der Patienten lassen sich mit diesen Verfahren bessern, und eine Arthrose-Entstehung kann dadurch aufgeschoben werden; ganz verhindern lässt sich die Arthrose damit meist nicht.

Ein Schwerpunkt unserer Arbeiten ist es, die grundlegenden genregulatorischen Netzwerke zu identifizieren, die der Knorpel- und Knochenentwicklung zugrunde liegen. Das soll es uns gestatten, die Entwicklung von Knorpel

aus Stammzellen gezielt anzustoßen, die Entwicklung auf der hyalinen Knorpelstufe anzuhalten oder aber – über eine zunehmende Mineralisierung – weiter bis hin zur Entwicklung von Knochen ablaufen zu lassen. Auf diese Weise könnte es möglich werden, Ersatzgewebe in abgestufter Härte nach der zonalen Struktur und Funktion gesunder Gelenke herzustellen. Womöglich können sich daraus auch neue medikamentöse Behandlungsweisen für die Arthrose ergeben.

Der Heidelberger Forschungsansatz

Der Körper kann zerstörte Knorpelzellen nicht ersetzen. Deshalb ist es wichtig, für Implantationen geeignete Zellquellen zu finden. Das aber ist schwierig. Ein Herausstanzen von Knorpel – wie es derzeit bei der autologen Knorpelzelltransplantation praktiziert wird – ist zu meiden, entstehen dadurch doch weitere Knorpeldefekte. Leichter zu gewinnen sind „Mesenchymale Stammzellen“ (MSC), Vorläuferzellen für verschiedene Zelltypen, die sich aus fast allen Geweben isolieren lassen. Im Labor lassen sich Mesenchymale Stammzellen zuverlässig zu Knorpelzellen heranzüchten (differenzieren). Es blieb aber eine unüberwindbare Hürde, die Entwicklung der Stammzellen auf der „Knorpelstufe“ anzuhalten und zu verhindern, dass sich der neue Knorpel über eine zunehmende Mineralisierung zu Knochen umwandelt. Aus Untersuchungen mit Tieren ist dieses Problem hinreichend

„Bestimmte Signalmoleküle stellen die Weichen für die Entwicklung von Stammzellen zu weichem Knorpel oder hartem Knochen.“

bekannt: Aus Mesenchymalen Stammzellen hergestellter Knorpelersatz, der Mäusen transplantiert wurde, wandelte sich unaufhaltsam in Knochen um. Nicht aus Stammzellen herangezüchtete natürliche (native) Knorpelzellen hingegen sind imstande, ein stabil bleibendes Knorpelgewebe aufzubauen, das nicht mineralisiert und sich nicht zu Knochen weiterentwickelt. Was hält die nativen Knorpelzellen davon ab, ihre Umgebung zu mineralisieren? Oder anders formuliert: Wie kann eine Mineralisierung von Knorpelersatzgewebe aus Mesenchymalen Stammzellen aufgehalten werden?

Um darauf eine Antwort zu finden, haben wir die regulatorischen Netzwerke von Mesenchymalen Stammzellen mit denen von nativen Knorpelzellen verglichen. Das Ergebnis: In knorpelig differenzierenden Mesenchymalen Stammzellen sind drei miteinander vernetzte Signalwege überaktiv („BMP“, „Hedgehog“ und „WNT“), die auch in der Wachstumsfuge von Bedeutung sind. Unterdrückt man während der Knorpelzüchtung im Labor jeweils einen dieser Signalwege, vermindert sich die Neigung des Gewebes, zu mineralisieren. Auch Gene, die für die Knochenentwicklung wichtig sind, werden dann weniger stark angeschaltet. Eine völlige Abschaltung dieser Gene konnte jedoch über einen einzelnen Signalweg nicht erreicht werden: Wie unsere Untersuchungen ergaben, mineralisierte das derart gewonnene Knorpelersatzgewebe nach der Implantation weiterhin, weil der jeweils im Labor zugesetzte Hemmstoff nun abwesend war. Daher galt es möglichst Maßnahmen zu ergreifen, um alle drei Signalwege gleichzeitig zu unterdrücken, und zwar dauerhaft auch nach der Implantation. Idealerweise sollte dies unter Einbeziehung eines biokompatiblen Zellträgers geschehen, der, bestückt mit allen

notwendigen Hemmstoffen, auch nach der Implantation noch lange im Körper verbleiben kann. Im Rahmen des interdisziplinären EU-Forschungsprojekts „Hydrozones“ haben wir, zusammen mit Forscherinnen und Forschern der Technischen Universität Dresden, ein neuartiges dreidimensionales Hydrogel weiterentwickelt und als Zellträger eingesetzt. Es ist modular aufgebaut und kann mit bioaktiven Substanzen bestückt werden. Benötigt werden vier Wirkstoffe: der für die Knorpelentwicklung der Zellen absolut notwendige Wachstumsfaktor TGF- β (Transforming Growth Factor beta) sowie jeweils ein Hemmstoff für jeden der drei erkannten überaktivierten Signalwege, eine durchaus komplexe Aufgabe.

Wir wussten bereits, dass Heparansulfate – sie bilden die Seitenketten der bereits erwähnten Proteoglykane – viele Wachstumsfaktoren, darunter auch TGF- β , sehr gut binden und sich somit für die erste Aufgabe eignen. Weiter war für andere Wachstumsfaktoren bekannt, dass ihre Wirkung durch Bindung an Heparansulfate stark abgeschwächt wurde, wobei das strukturell ähnliche, stärker sulfatierte Heparin noch besser wirkte. Unsere Arbeitshypothese lautete: Falls Heparansulfat und Heparin imstande sind, Moleküle der Signalwege BMP, Hedgehog und WNT der Verfügbarkeit durch die Zellen zu entziehen, könnte es gelingen, alle drei Signalwege gleichzeitig mit einer Substanz zu hemmen und dadurch den Entwicklungsweg von Mesenchymalen Stammzellen zu Knochenzellen aufzuhalten. Über das Entfernen bindungsrelevanter Sulfatreste aus Heparin könnten zudem weitere Abstufungsmöglichkeiten gewonnen werden. Diese Hypothese war durchaus kühn, implizierte sie doch, alle vier komplexen Aufgaben mit nur einem einzigen Molekül zu lösen: dem Heparansulfat-Analogen Heparin.

„Mit unseren Forschungsarbeiten ist ein Meilenstein für ein gezieltes Steuern der Knorpelentwicklung erreicht.“

OSSIFIED?

NEW BIOMATERIALS FOR STRONG JOINTS

WILTRUD RICHTER

To this day, building replacement tissue from more than one type of tissue remains an immense challenge. It requires not only a detailed knowledge of the crucial pathways and switching points involved in the differentiation of precursor cells into distinct directions, but also the technical ability to control the spatial dimension of each tissue area and to stabilise the results. A key task in all this lies in offering the cells a suitable micro-environment for structured tissue development.

During embryonic development, the complex extracellular matrix provides this micro-environment and ensures, among other things, the formation of zones of decreasing hardness at the end of the long bones, from hard bone to a slightly softer intermediate layer of mineralised cartilage and finally the compressible articular cartilage. These zones are crucial for the proper mechanical functioning of the joint. They evolve through the action of so far unknown molecular stop signals that block the further development of hyaline cartilage into mineralised cartilage and then into bone in specific areas of the locomotor system.

Within the framework of an interdisciplinary EU project, we were able to discover the key features of crucial molecular stop signals among the numerous messages of the extracellular matrix and offer them to stem cells via a new and innovative biomaterial. The novel approach stops the evolution of cartilage into bone and enables the development of stable hyaline cartilage of human origin in a living organism. Alternatively, we can also guide the process towards the formation of mineralising cartilage and bone. Not only will these findings permit us to grow zonally structured joint replacement tissues, e.g. using bioprinting methods. They also open up new pharmacological possibilities of preventing undesired cartilage mineralisation in osteoarthritis patients. ●

PROF. DR WILTRUD RICHTER has held the Chair of Experimental Orthopaedics at Heidelberg University since 2004 and heads the Research Centre for Experimental Orthopaedics at Heidelberg University Hospital. Before she came to Heidelberg, she was a researcher at the University of California, San Francisco (USA) and at the University of Ulm, her alma mater, from which she graduated with degrees in biology and chemistry. With her research, Wiltrud Richter aims to regenerate tissue damage in the locomotor system using novel biomaterials and artificially grown biological tissue.

Contact: wiltrud.richter@med.uni-heidelberg.de

“Certain signalling molecules set the points towards the evolution of stem cells into soft cartilage or hard bone.”

Der erhoffte Durchbruch

Die Vorversuche gingen in die richtige Richtung: Das mit Heparin aufgerüstete Hydrogel band den beigemischten Wachstumsfaktor TGF- β nachhaltig und unterdrückte bei kluger Wahl der Dosis sowohl BMP- als auch Hedgehog- und WNT-Signale. Darüber hinaus ließ sich zeigen, dass sich die hemmende Wirkung abschwächen oder aufheben ließ, wenn man bestimmte Sulfatgruppen entfernte. Ausgedehnte Versuchsreihen mit dem neuen Trägermaterial im lebenden Organismus erbrachten schließlich den erhofften Durchbruch: Aus Mesenchymalen Stammzellen, die aus menschlichem Knochenmark gewonnen worden waren, ließ sich erstmalig neuer Knorpel züchten, der resistent gegen Mineralisierung war, stabil Knorpel bildete und sich auch nach längerer Zeit nicht zu Knochengewebe weiterentwickelte. Senkte man den Heparin-Sulfatspiegel auf etwa ein Drittel, stellten sich die Weichen anders: Dann begann der Knorpel zu mineralisieren und entwickelte sich zu Knochen mit allen seinen charakteristischen Merkmalen.

Damit ist ein Meilenstein für ein gezieltes Steuern der Knorpel- beziehungsweise Knochenentwicklung erreicht. Mit dem Sulfatierungsstatus von Heparansulfaten halten wir zudem den Schlüssel für die Weichenstellung und den Erhalt der Stabilität von hyalinem Knorpel in der Hand. Neben der Aussicht, zonal strukturiertes Knorpelersatzgewebe im Labor züchten zu können, kann dieses Wissen künftig womöglich auch genutzt werden, um unerwünschte Mineralisierungen während des Entstehens der Arthrose medikamentös zu verhindern. Unserem Kooperationspartner Carsten Werner vom Leibniz-Institut für Polymerforschung in Dresden ist es inzwischen gelungen, das Hydrogel über Biodruckverfahren gezielt zu zonalen Strukturen aufzubauen. Für weitere Charakterisierungen stehen also spannende Aufgaben bevor. ●



PROF. DR. WILTRUD RICHTER ist seit 2004 Professorin für Experimentelle Orthopädie an der Universität Heidelberg und leitet das Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie am Universitätsklinikum Heidelberg. Vor ihrer Berufung nach Heidelberg forschte sie an der University of California, San Francisco (USA) sowie an der Universität Ulm, wo sie zuvor Biologie und Chemie studierte. Das Ziel von Wiltrud Richters Forschung ist es, Gewebeschäden im Bewegungsapparat mithilfe neuartiger Biomaterialien und der künstlichen Herstellung biologischer Gewebe zu regenerieren.

Kontakt: wiltrud.richter@med.uni-heidelberg.de

Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie

Das Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie ist eine unabhängige Einrichtung im Zentrum für Orthopädie, Unfallchirurgie und Paraplegiologie am Universitätsklinikum Heidelberg. Das interdisziplinäre Team widmet sich der Entwicklung neuer und innovativer Ansätze zur Regeneration beschädigter Gewebe des Bewegungsapparates. Ziel ist es, durch weitere Aufklärung der molekularen und zellulären Grundlagen biologischer Regenerationsprozesse die Heilung von geschädigtem Knorpel-, Knochen- und Bandscheibengewebe zu verbessern. Hierzu setzen die Forscher:innen Wachstumsfaktoren, funktionalisierte Biomaterialien, lebende Zellen und durch sogenannte Tissue-Engineering-Verfahren gezüchteten Gewebersatz ein, der auch durch neue Fabrikationsmethoden wie Bioprinting hergestellt wird.